

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA Y LEGISLACIÓN SANITARIA



TESIS DOCTORAL

**Efectos neurotóxicos del cadmio sobre las neuronas
colinérgicas del prosencéfalo basal y su implicación en la
inducción de alteraciones cognitivas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mariano de Frías González

DIRECTORES

Javier del Pino Sans
María José Anadón Baselga
María Teresa Frejo Moya

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa De Doctorado En Investigación En Ciencias

Médico-Quirúrgicas

Departamento De Toxicología y Legislación Sanitaria



**EFFECTOS NEUROTÓXICOS DEL CADMIO SOBRE LAS
NEURONAS COLINÉRGICAS DEL PROSENCÉFALO BASAL
Y SU IMPLICACIÓN EN LA INDUCCIÓN DE
ALTERACIONES COGNITIVAS.**

MARIANO DE FRÍAS GONZÁLEZ

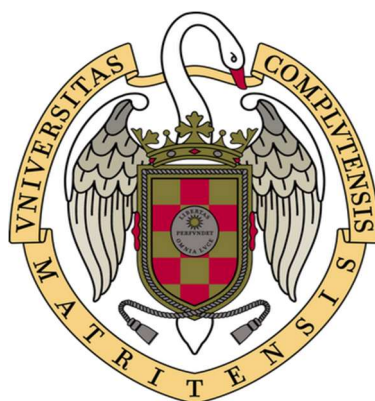
Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa De Doctorado En Investigación En Ciencias Médico-Quirúrgicas

Departamento De Toxicología y Legislación Sanitaria



**EFFECTOS NEUROTÓXICOS DEL CADMIO SOBRE LAS NEURONAS
COLINÉRGICAS DEL PROSENCÉFALO BASAL Y SU IMPLICACIÓN
EN LA INDUCCIÓN DE ALTERACIONES COGNITIVAS.**

MARIANO DE FRÍAS GONZÁLEZ

Javier del Pino Sans, María José Anadón Baselga, María Teresa Frejo Moya

Madrid, 2018

D. JAVIER DEL PINO SANS Profesor Contratado Doctor del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria, **Dña. MARIA JOSE ANADÓN BASELGA**, Profesora Titular del Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Facultad de Medicina y **Dña. MARIA TERESA FREJO MOYA**, Profesor Titular del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN: Que D. MARIANO DE FRÍAS GONZÁLEZ ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado: “EFECTOS NEUROTÓXICOS DEL CADMIO SOBRE LAS NEURONAS COLINÉRGICAS DEL PROSENCÉFALO BASAL Y SU IMPLICACIÓN EN LA INDUCCIÓN DE ALTERACIONES COGNITIVAS”, el cual consideramos que reúne las condiciones y la calidad científica deseadas para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste se expide el presente certificado en Madrid, a 27 de noviembre de dos mil diecisiete.

El Director

La Directora

La Directora

Fdo.: Javier del Pino Sans

Fdo.: M^a José Anadón Baselga

Fdo.: M^a Teresa Frejol Moya

Deseo expresar mi agradecimiento:

- A la Prof. Dra. María José Anadón Baselga, por la dirección de esta Memoria y por todas las enseñanzas y el apoyo recibido a lo largo de este período de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral, así como por todos los medios y consejos puestos a mi disposición.

- Al Prof. Dr. Javier del Pino Sans, por la dirección de esta Memoria, siempre con tiempo para enseñar y ayudar en el siguiente paso, por su paciencia, por el apoyo recibido a lo largo de este período de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.

- A la Prof. Dña. María Teresa Frejo Moya, por la dirección de esta Memoria, por las puntualizaciones y matices, por todas las enseñanzas y el apoyo recibido a lo largo de este período de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.

Dedicatorias:

- A Carmen, gracias por todos los años de compañía, por estar siempre a mi lado cuanto te necesito, por tu apoyo incondicional, comprensión y esfuerzo para ayudarme a sacar adelante esta Tesis.
- A Blanca y Ana, los luceros que me guían de día y me iluminan de noche.
- A mi padre y a la memoria de mi madre, su amor y trabajo han sido fuente y fuerza de motivación durante toda mi vida.
- A mis hermanos, por su compañía durante el camino.
- A Margarita y Antonio, por su constante estímulo y apoyo que han hecho posible que este trabajo se llevara a cabo.

LISTADO DE ACRONIMOS EMPLEADOS EN ESTA TESIS

- Cd-cadmio
- GSK-3 β -glucógeno sintetasa quinasa 3
- A β -proteína beta amiloide
- β APP-proteína precursora beta amiloidea
- AChE-Acetilcolinesterasa
- BHE-barrera hematoencefálica
- IARC-Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
- CAS-Chemical Abstracts Service
- CdCl₂-cloruro de cadmio
- CdBr₂-bromuro de cadmio
- CdI₂-yoduro de cadmio
- Cd(NO₃)₂-nitrato de cadmio
- CdSO₄-sulfato de cadmio
- CdO-oxido de cadmio
- CdS-sulfuro de cadmio
- CdCO₃-carbonato de cadmio
- Cd₃(PO₄)₂-ortofosfato de cadmio
- CdF₂-fluoruro de cadmio
- Zn-zinc
- Fe-hierro
- Cu-cobre
- Ca-calcio
- TWI-ingesta semanal tolerable
- Cd-MT-Cd unido a metalotioneínas
- MT-metalotioneínas
- DMT1-proteína transportadora de metales divalentes
- ZTL1-transportadores apicales de zinc
- PC-plexo coroideo
- FCE-fluido cerebro espina
- GABA-ácido gamma aminobutírico
- LPO-lipoperoxidación
- GPx-antioxidantes glutatión peroxidasa
- CAT-catalasa
- SOD-superoxidodismutasa
- IP3R1-receptor de inositol trifosfato 1
- NF- κ B-factor nuclear kapa beta
- UV-ultra violeta
- VER-reparación de la ruptura de las bases
- NER-reparación de la escisión de nucleótidos
- MMR-reparación incorrecta
- hOGG1-8-oxoguanina ADN N-glicosilasa 1 humana
- Fpg-formamidopirimidina

- Glicosilasa
- U-uracilo
- C-citosina
- AP-sitios apurínicos-apirimidínicos
- XPC-proteína nuclear C de xeroderma pigmentoso
- XPA-proteína Xeroderma pigmentoso A
- GSH-glutación
- ZIP8-transportador de zinc humano8
- PKC-proteína quinasa C
- ERK-proteína quinasa regulada por señal extracelular
- GSSG-glutación disulfuro
- Calu3-células epiteliales de las vías respiratorias humanas
- BALF-líquido de lavado broncoalveolar
- TNF- α -factor de necrosis tumoral alfa
- IL-1 β -la interleuquina-1beta
- IMAC-1-moléculas de adhesión intercelular-1
- VCAM-1-moléculas de adhesión celular vascular-1
- EA-enfermedad de Alzheimer
- iso-OMPA-tetraisopropilo pirofosforamida
- DMSO-dimetil sulfóxido
- DMEM-medio Eagle modificado de Dulbecco
- FBS-suero bovino fetal
- PBS-solución salina tamponada con fosfato
- BHT-butil hidroxitolueno
- TBA- terbutanol
- SNC-Sistema nervioso central
- ADN-Ácido desoxirribonucleico
- ARN-Ácido ribonucleico
- EA- Enfermedad de Alzheimer
- AChE-Acetilcolinesterasa
- ERO-Especies reactivas de oxígeno
- ChAT-Acetiltransferasa de colina
- ACh-Acetilcolina
- EFSA-Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
- MDA-Malondialdehído
- LDH-Lactato deshidrogenasa
- H₂O₂-Peróxido de Hidrógeno
- CHT-Transportador de colina de alta afinidad
- NAC-N-acetil cisteína
- MAP-2-Proteína asociada a los microtúbulos
- QPCR-Reacción en Cadena de la Polimerasa semicuantitativa
- ACTB-Gen de la beta actina
- DE-Desviación Estándar
- P53-Proteína tumoral 53

- RM1-Receptores muscarínico 1
- ChAT-Colina acetiltransferasa
- AC-Adenilato ciclasa
- GFAP-Proteína gliofibrilar ácida
- VACHT-Transportador de la acetilcolina vesicular
- MTT-Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

ÍNDICE

SUMARY.....	13
RESUMEN.....	21
1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	30
2. INTRODUCCIÓN.....	35
3. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	40
3.1. Cadmio	41
3.1.1. Propiedades Fisicoquímicas	
3.1.2. Fuentes del Cadmio	
3.2. Metabolismo.....	45
3.2.1. Absorción	
▪ Absorción gastrointestinal	
▪ Absorción pulmonar	
3.2.2. Distribución	
3.3 Mecanismos de acción.....	48
3.4. Toxicidad.....	55
3.4.1. Toxicidad renal	
3.4.2. Toxicidad ósea	
3.4.3. Toxicidad pulmonar	
3.4.4. Toxicidad hepática	
3.4.5. Toxicidad para la reproducción	
3.4.6. Neurotoxicidad	
▪ Neurotoxicidad en el desarrollo por cadmio	
▪ Efectos cognitivos	
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	77
4.1. Productos químicos.....	78

4.2. Cultivo primario de neuronas del prosencéfalo basal.....	78
4.3. Línea celular SN56.....	81
4.4. Protocolo y diseño experimental.....	82
4.4.1. Análisis histoquímicos de la toxicidad selectividad sobre las neuronas colinérgicas.	
4.4.2. Análisis de la viabilidad celular de neuronas SN56	
4.4.3. Silenciamiento de genes	
4.4.4. Análisis de las actividades enzimáticas en neuronas SN56	
4.4.5. Análisis de la concentración de ACh en neuronas SN56	
4.4.6. Análisis de la expresión génica	
4.4.7. Análisis de la inducción de estrés oxidativo en neuronas SN56	
4.4.8. Análisis de bloqueo de los receptores muscarínicos M1 en neuronas SN56	
4.4.9. Análisis del contenido de proteínas beta-amiloides y Tau en neuronas SN56	
4.4.10. Análisis estadístico	
5. RESULTADOS.....	95
5.1. Efecto del cadmio sobre la viabilidad de las neuronas colinérgicas del PSB.....	96
5.2. Efecto del silenciamiento de M1R en las neuronas del PSB	96
5.3. Efecto del cadmio sobre la viabilidad de células SN56 a través de los ensayos del MTT y el LDH.....	99
5.4. Efecto del cadmio sobre la actividad de las caspasas 3/7 en células SN56.....	104
5.5. Efecto del cadmio sobre la actividad de la AChE y la ChAT en células SN56.....	106
5.6. Medición del nivel de acetilcolina en células SN56.....	108
5.7. Efecto del cadmio sobre la expresión génica de células SN56.....	109
5.8. Efecto del cadmio sobre el receptor muscarínicos M1 en células SN56.....	114

5.9. Efecto del cadmio sobre el contenido de proteínas A β y Tau en células SN56.....	115
5.10. Efecto del cadmio sobre la actividad de ChAT en células SN56.....	120
5.11. Efecto del cadmio sobre inducción de peroxidación lipídica en células SN56...	122
5.12. Efecto del cadmio sobre los niveles de peróxido de hidrógeno.....	123
6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	124
7. CONCLUSIONES.....	135
8. BIBLIOGRAFÍA.....	139

SUMARY

SUMARY

CADMIUM NEUROTOXIC EFFECTS ON BASAL FOREBRAIN CHOLINERGIC NEURONS AND ITS IMPLICATIONS IN THE INDUCTION OF COGNITIVE DISFUNCTIONS

INTRODUCTION

Cadmium (Cd) is a neurotoxic compound that produces cognitive dysfunctions, although the mechanisms involved are unknown. The learning and memory processes are regulated by the cholinergic system of the basal forebrain, therefore blockade of cholinergic transmission or death of cholinergic neurons in this region could be related to the deterioration of cadmium-induced memory. In this sense, it has been described in other brain regions that cadmium blocks cholinergic transmission through the reduction of choline acetyltransferase (ChAT) activity and in turn blocks muscarinic receptors which may, in addition to participating in cholinergic transmission, participate in the maintenance of neuronal viability, specifically the muscarinic M1receptor (M1R). It has also been reported to induce selective killing of cholinergic neurons at the peripheral level. In addition, cadmium has been reported to activate the enzyme glycogen synthase kinase 3 (GSK-3 β), induces phosphorylation of Tau proteins and formation of amyloid beta (A β) proteins in brain regions other than the basal forebrain, and these mechanisms have been linked to the induction of selective killing of cholinergic neurons Of the basal forebrain in Alzheimer's disease. Also, it has been pointed out that cadmium generates reactive oxygen species (ROS) which can induce the described mechanisms. Finally, it has been described in other brain regions that all these effects are regulated by the M1 receptor. Consequently, we hypothesized that cadmium induces blockade of cholinergic transmission and a selective death of cholinergic neurons of the basal forebrain mediated by the generation of ROS that partly mediate the blockade of M1 receptors, which trigger this effect through of the induction

mechanisms described in other brain regions through altered expression of acetylcholinesterase (AChE) variants. Our results may help explain the cognitive dysfunctions observed in cadmium toxicity.

MATERIAL AND METHODS

To test our hypothesis, we first used primary cultures of basal forebrain neurons to evaluate the selectivity of cadmium toxicity on cholinergic central nervous system (CNS) neurons and to evaluate whether M1R silencing induces a more pronounced death on basal forebrain cholinergic neurons. As a marker of cholinergic neurons, we chose AChE, because all cholinergic neurons in the basal forebrain express AChE, which makes it a valid marker for cholinergic neurons in this region (Makuch et al., 2001). In addition, it is expressed during growth of cholinergic axons, whereas ChAT, also a marker of cholinergic neurons, may not be expressed during growth (Makuch et al., 2001).

Second, we used SN56 cells, a murine neuroblastoma cholinergic cell line derived from septal neurons (Hammond et al., 1990), as a model of cholinergic neurons in the anterior basal brain region to evaluate the toxic effects of Cd on this specific type of Neurons and the mechanisms through which they are induced. SN56 cells were differentiated because they have been reported to be more sensitive to neurotoxic composting that affect cholinergic pathways (Bielarczyk et al., 2003, Szutowicz et al., 2006).

In SN56 neurons treated for 24 h with Cd at concentrations between 0.1 μ M to 10 mM with or without N-acetyl cysteine (NAC, 1 mM) and with or without Ach (0.01 μ M-100 μ M), The effect of cadmium on the cellular content of acetylcholine (ACh), malondialdehyde

(MDA), lactate dehydrogenase (LDH) and the content of hydrogen peroxide (H_2O_2), AChE and acetylcholine transferase activities, M1R blockade, and on the expression of AChE variants, high affinity choline transporter (CHT), vesicular acetylcholine transporter (VACHT), muscarinic M1receptor, GSK-3 β and amyloid beta precursor protein (β APP), as well as the effects of the silencing of AChE, M1R, GSK-3 β and β APP or the co-treatment with antioxidants on cell viability and the interaction of these mechanisms between them. SN56 cells were plated in 6-well plates at a density of 10^6 cells/well. At least 3 replicates per well/ treatment were used. A vehicle treated group was used in parallel for each experiment as a control group.

There is little information on the concentration of cadmium that can reach the CNS both after acute and chronic exposure. The greatest chronic exposure occurs in mine workers and industries such as foundries, battery factories, welding, waste incineration plants and pigment production, or in residents of areas contaminated with cadmium because of their proximity to these industries. In this sense, it has been described that miners chronically exposed to cadmium reach levels up to $6.2\ \mu\text{M}$ in the CNS (Falnoga et al., 2000). Also, residents living near a smelter have reported that cadmium levels present in the CNS were around $1.4\ \mu\text{M}$ (Auermann et al., 1979). On the other hand, the levels of cadmium in the CNS determined in the autopsies of patients with Alzheimer's disease reached up to $1.2\ \mu\text{M}$ (Panayi et al., 2002). The observed values of cadmium in different brain regions at autopsies of control individuals were from $0.2\ \mu\text{M}$ to $0.9\ \mu\text{M}$ (Falnoga et al., 2000, Panayi et al., 2002). It has been reported that smokers present in their body twice the levels of cadmium present in nonsmokers, and these values are four times higher in large smokers (ATSDR, 2012), implying that levels in their brain could be greater than $1\ \mu\text{M}$ taking into account the normal values found in non-smokers. In addition, it has been reported that blood brain barrier (BBB) is not fully developed in young animals (Wang y Du, 2013), so that cadmium concentrations higher than those reached in adults may reach the brain, although data are not available. According to these data, those of cadmium concentrations

from 1 μM to 10 μM would be relevant for chronic human exposure. Acute exposure may occur in large doses as an occupational hazard or accidental escape of cadmium. In these cases, there is no information on the levels of cadmium that could reach the CNS, although it would probably be around 100 μM , as described by Hossain et al. (2009). Therefore, cadmium concentrations from 10 μM to 100 μM would be relevant for high acute levels of exposure. In this sense, we have chosen the concentrations from 1 μM to 100 μM to determine the effects of cadmium on cell viability, selective toxicity on cholinergic neurons of PSB, gap of M1R, content of cellular proteins A β 1-40, A β 1-42, total and phosphorylated Tau, and the expression of the enzyme GSK-3 β and variants of AChE. We chose the 10 μM concentration to be relevant for both acute and chronic toxicity, to test the hypothesis that cadmium mediates its mechanisms described by blocking the M1R through the AChE variants. Figure 1 represents the experimental design followed in the research.

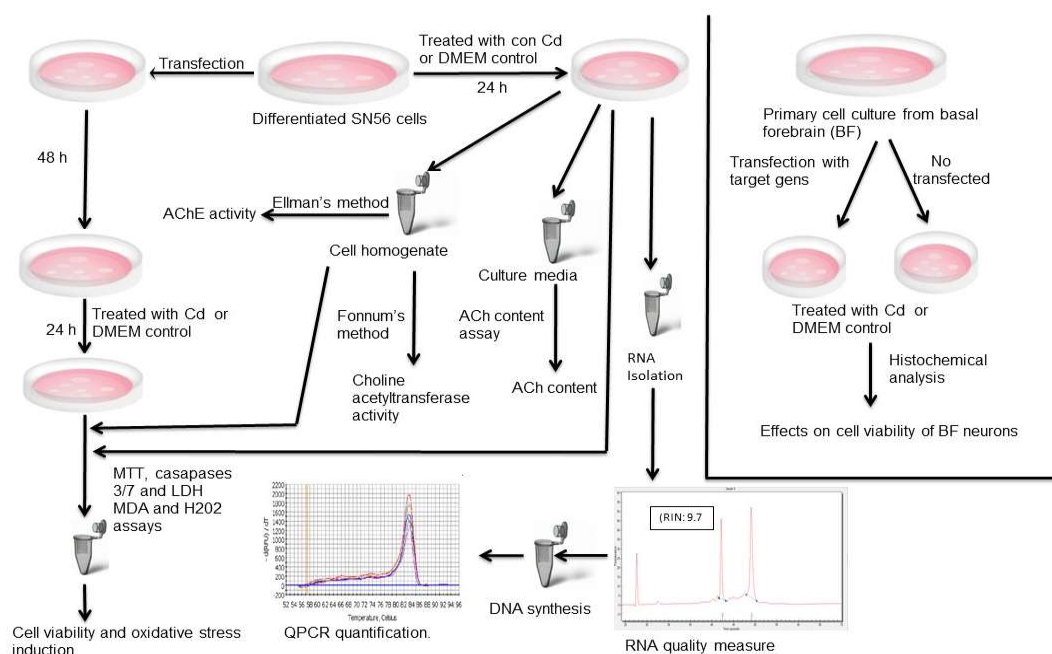


Figure 1. Summarizes the protocol and experimental design followed in this investigation

RESULTS AND DISCUSSION

The present study demonstrates that cadmium induced cell death, in a concentration-dependent manner, in the primary neuronal culture used from the basal forebrain region, this being more pronounced on AChE positive neurons, indicating that cholinergic neurons are more sensitive to the toxicity of cadmium. The observed difference between cadmium-induced selective cell death on cholinergic neurons at peripheral nervous system level and the more pronounced but non-selective death on cholinergic neurons of the basal forebrain may be related to differences in cadmium distribution and accumulation in different regions, just as these differences are observed within the spinal cord. On the other hand, in the culture of cholinergic neurons SN56 we observed a concentration-dependent reduction of cellular viability with the apoptosis induction to the necrosis.

In addition, we observed in the SN56 neuron culture a concentration-dependent decrease in ACh levels correlated with the concentration-dependent reduction of ChAT activity, but not the alteration of AChE activity as a function of concentration. ACh plays a role in cell survival through cholinergic receptor activation (Resende and Adhikari, 2009), and a reduction in their levels could induce cell death. However, the co-incubation of ACh with cadmium was not able to reduce cell death induced by cadmium, suggesting that other mechanisms must be involved. In this sense, cadmium blocked the M1R receptors in the range of concentrations previously described, which support our results and could explain why co-administration of cadmium ACh did not reverse the observed effects on the viability of cholinergic neurons Basal forebrain. In addition, results show that blockade of M1R by cadmium contributes significantly to the more pronounced cell death of cholinergic neurons, but suggest that other mechanisms are involved in this effect.

In this sense, cadmium treatment of SN56 neurons also increased expression of the AChE-S variant and decreased expression of the AChE-R variant, as well as increased levels of total and phosphorylated A β , Tau and increased expression of the enzyme GSK-3 β , which is in agreement with previous studies (Wang et al., 2007). However, the cadmium treatment of the silenced SN56 cells against AChE, β APP or GSK-3 β partially reversed the induction of cell death in each case, and in the latter case also the increase in the levels of total and phosphorylated Tau proteins, which evidenced the implication of these mechanisms in inducing the death of cholinergic septal neurons. In addition, the cadmium treatment of simultaneously silenced SN56 cells for AChE, M1R, β APP and GSK-3 β reduced the increase in cell death produced by treatment with cadmium alone. These data suggest that mechanisms other than those described above are implicated in cell death induced on cholinergic septal neurons. Blocking of the M1R medium induces the mechanisms described that lead to the generation of neuronal death and alteration of cholinergic transmission through altered AChE variants, but which other mechanisms may be involved. The cadmium treatment of the SN56 cells induced the generation of ROS and of lipid peroxidation leading to the induction of cell death. The generation of ERO means the activation of all mechanisms described in part through the blockage of the M1R and these in turn through the alteration of the variants of AChE.

CONCLUSIONS

Cadmium induces an alteration in cholinergic transmission and a more pronounced but non-selective cell death on cholinergic neurons in the basal prosencephalo, mediated in part by the induction of ROS and the blocking of muscarinic M1 receptors. Blockade of muscarinic receptors by cadmium is mediated in part by the generation of ROS. On the other hand, these

two actions induce in part the alteration of AChE variants which induce the overexpression of GSK-3 β and an increase in total and phosphorylated A β , Tau proteins that give rise to neuronal death. Therefore, the observed effects on cholinergic neurons of the basal forebrain may be, in part, responsible for learning deficits observed in cadmium toxicity. On the other hand, although higher levels of cadmium have been found in the brain tissues of patients with AD than in healthy individuals and has been reported as a possible risk factor for AD, their involvement has not yet been demonstrated. Our results could support its possible implication because cadmium altered the main markers of AD. However, they could also suggest that cadmium toxicity may share some mechanisms with AD that induce the symptoms they share. Further studies should be developed with the objective of determining the remaining mechanisms involved in the most pronounced cell death observed in cholinergic neurons and also the complete mechanisms by which the generation of ROS and the blockage of M1R mediates this effect, as well as To corroborate in vivo that this effect mediates the cognitive disorders observed after exposure to cadmium. These results are of great interest because they could lead to a better understanding of the mechanisms responsible for producing the cognitive alterations induced by cadmium.

RESUMEN

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El cadmio (Cd) es un compuesto neurotóxico que produce disfunciones cognitivas, aunque los mecanismos implicados son desconocidos. Los procesos de aprendizaje y memoria son regulados por el sistema colinérgico del prosencéfalo basal, por lo tanto, el bloqueo de la transmisión colinérgica o la muerte de neuronas colinérgicas en esta región podrían estar relacionados con el deterioro de la memoria inducido por el cadmio. En este sentido, se ha descrito en otras regiones cerebrales que el cadmio bloquea la transmisión colinérgica a través de la reducción de la actividad de la acetilcolina transferasa (ChAT) y a su vez bloquea receptores muscarínicos, los cuales pueden además de participar en la transmisión colinérgica participar en el mantenimiento de la viabilidad neuronal, específicamente los receptores muscarínicos M1 (RM1). También se ha descrito que induce la muerte selectiva de neuronas colinérgicas a nivel periférico. Además, se ha descrito que el cadmio activa la enzima glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK-3 β), induce la fosforilación de proteínas Tau y la formación de proteínas amiloideas beta (A β) en regiones cerebrales distintas al prosencéfalo basal, y dichos mecanismos se han relacionado con la inducción de muerte selectiva de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal en la enfermedad de Alzheimer. También, se ha descrito que el cadmio genera especies reactivas de oxígeno (ERO) las cuales pueden inducir los mecanismos descritos. Finalmente, se ha descrito en otras regiones cerebrales que todos estos efectos son regulados por el receptor M1. En consecuencia, nosotros hipotetizamos que el cadmio induce el bloqueo de la transmisión colinérgica y una muerte selectiva de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal mediada por la generación de ERO que media en parte el bloqueo de los receptores M1, los cuales desencadenan este efecto a través de la inducción de los mecanismos descritos en otras regiones cerebrales a través de la alteración de la expresión de las variantes

de la AChE. Nuestros resultados podrían ayudar a explicar las disfunciones cognitivas observadas en la toxicidad de cadmio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para probar nuestra hipótesis, en primer lugar, utilizamos cultivos primarios de neuronas del prosencéfalo basal para evaluar la toxicidad selectividad del cadmio sobre las neuronas colinérgicas del sistema nervioso central (SNC) y para evaluar si el silenciamiento de M1R induce una muerte más pronunciada sobre las neuronas colinérgicas de prosencéfalo basal. Como marcador de las neuronas colinérgicas, elegimos la acetilcolinesterasa (AChE), debido a que todas las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal expresan AChE, lo que la convierte en un marcador válido para las neuronas colinérgicas de esta región (Makuch et al., 2001). Además, se expresa durante el crecimiento de los axones colinérgicos, mientras que la ChAT, también marcador de las neuronas colinérgicas, puede no ser expresado durante el crecimiento de los mismos (Makuch et al., 2001).

En segundo lugar, utilizamos células SN56, una línea celular colinérgica de neuroblastoma murino derivada de neuronas septales (Hammond et al., 1990), como modelo de neuronas colinérgicas de la región cerebral basal anterior para evaluar los efectos tóxicos del cadmio en este tipo específico de neuronas y los mecanismos a través de los que son inducidos. Las células SN56 fueron diferenciadas porque se ha descrito que son más sensibles a compuestos neurotóxicos que afectan a las vías colinérgicas (Bielarczyk et al., 2003, Szutowicz et al., 2006).

Se evaluó, en neuronas SN56 tratadas durante 24 horas con cadmio a concentraciones entre 0,1 μM a 10 mM con o sin N-acetil cisteína (NAC; 1 mM) y con o sin ACh (0,01 μM -100 μM), el efecto del cadmio sobre el contenido celular de acetilcolina (ACh), del malondialdehído (MDA), del contenido de lactato deshidrogenasa (LDH) y el contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), las actividades de la AChE y la ChAT, el bloqueo del receptor muscarínico M1, la expresión génica de la AChE y sus variantes, del transportador de colina de alta afinidad (CHT), del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), del receptor muscarínico M1, GSK-3 β y la proteína precursora beta amiloidea (βAPP), así como los efectos del silenciamiento de AChE, RM1, GSK-3 β y βAPP o el co-tratamiento con antioxidantes sobre la viabilidad celular y de la interacción de estos mecanismos entre sí. Las células SN56 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 10^6 células/pocillo. Se usaron al menos 3 réplicas por pocillo/ tratamiento. Un grupo tratado con vehículo se utilizó en paralelo para cada experimento como un grupo de control.

Existe poca información sobre la concentración de cadmio que puede llegar al SNC tanto tras exposición aguda como crónica. La mayor exposición crónica ocurre en los trabajadores de minas e industrias como fundiciones, fábricas de baterías, soldaduras, plantas de incineración de residuos y producción de pigmentos o en los residentes de áreas contaminadas con cadmio por su proximidad a de estas industrias. En este sentido, se ha descrito que los mineros expuestos crónicamente al cadmio alcanzan niveles de hasta 6,2 μM en el SNC (Falnoga et al., 2000). También, se ha descrito en los residentes que vivían próximos a una fundición que los niveles de cadmio presentes en el SNC eran en torno a 1,4 μM (Auermann et al., 1979). Por otra parte, los niveles de cadmio en el SNC determinados en las autopsias de pacientes con enfermedad de Alzheimer alcanzaron hasta 1,2 μM (Panayi et al., 2002). Los valores observados de cadmio en diferentes regiones cerebrales en las autopsias de los individuos

control fueron desde 0,2 μM a 0,9 μM (Falnoga et al., 2000, Panayi et al., 2002). Se ha descrito que los fumadores presentan en su cuerpo dos veces los niveles de cadmio presentes en los no fumadores, y estos valores son cuatro veces más altos en los grandes fumadores (ATSDR, 2012), lo que implica que los niveles en su cerebro podrían ser superiores a 1 μM teniendo en cuenta los valores normales encontrados en los no fumadores. Además, se ha descrito que la barrera hematoencefálica (BHE) no está completamente desarrollada en los animales jóvenes (Wang y Du, 2013), por lo que pueden llegar al cerebro concentraciones de cadmio más altas que las que se alcanzan en adultos, aunque no hay datos disponibles. De acuerdo con estos datos, las concentraciones de cadmio desde 1 μM a 10 μM serían relevantes para la exposición humana crónica. La exposición aguda puede ocurrir a grandes dosis como riesgo ocupacional o por una fuga accidental de cadmio. En estos casos no hay información de los niveles de cadmio que podrían llegar al SNC, aunque probablemente estaría alrededor de 100 μM , como ha descrito Hossain et al. (2009). Por lo tanto, las concentraciones de cadmio desde 10 μM a 100 μM serían relevantes para altos niveles agudos de exposición. En este sentido, hemos elegido las concentraciones desde 1 μM a 100 μM para determinar los efectos del cadmio sobre la viabilidad celular, toxicidad selectiva sobre las neuronas colinérgicas del PSB, el bloqueo de M1R, el contenido celular de las proteínas A β 1-40, A β 1-42, Tau totales y fosforiladas, y la expresión de la enzima GSK-3 β y las variantes de la AChE. Hemos elegido la concentración de 10 μM por ser relevante para tanto la toxicidad aguda como crónica, para probar la hipótesis de que el cadmio media sus los mecanismos descritos por bloqueo del RM1 a través de las variantes de la AChE. La Figura 1 representa el diseño experimental seguido en la investigación.

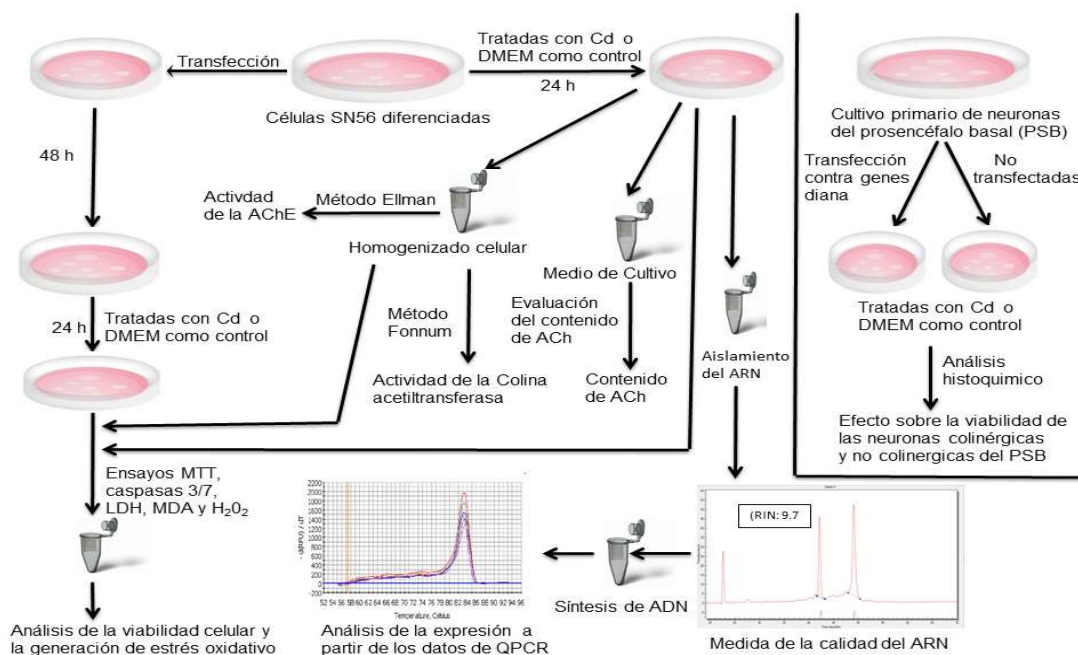


Figura 1. Representación esquemática del diseño experimental de la investigación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que el cadmio indujo muerte celular, de una manera concentración-dependiente, en el cultivo primario neuronal empleado procedente de la región del prosencéfalo basal, siendo este efecto más pronunciado sobre las neuronas AChE positivas, lo que indica que las neuronas colinérgicas son más sensibles a la toxicidad del cadmio. La diferencia observada entre la muerte celular selectiva inducida por el cadmio sobre las neuronas colinérgicas a nivel del sistema nervioso periférico y la muerte más pronunciada pero no selectiva sobre las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal puede estar relacionada con diferencias en la distribución y acumulación del cadmio en distintas regiones, de igual manera que se observan estas diferencias dentro de la medula espinal. Por otro lado, en el cultivo de neuronas colinérgicas SN56 observamos una reducción concentración-dependiente de la viabilidad celular con la inducción de apoptosis y la necrosis.

Además, observamos en el cultivo de neuronas SN56 una disminución concentración-dependiente en los niveles de ACh correlacionada con la reducción, concentración-dependiente, de la actividad de la ChAT, pero no de la alteración de la actividad de la AChE en función de la concentración. La ACh desempeña un papel en la supervivencia celular a través de la activación del receptor colinérgico (Resende y Adhikari, 2009), y una reducción en sus niveles podría inducir la muerte celular. Sin embargo, la co-incubación de la ACh con cadmio no fue capaz de reducir la muerte celular inducida por el cadmio, lo que sugiere que otros mecanismos deben estar implicados. En este sentido, el cadmio bloqueó los receptores RM1 en el rango de las concentraciones previamente descrito, lo cual respalda nuestros resultados y podría explicar por qué la co-administración de ACh con cadmio no revirtió los efectos observados sobre la viabilidad de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. Además, los resultados muestran que el bloqueo del M1R por el cadmio contribuye significativamente a la muerte celular más pronunciada de las neuronas colinérgicas, pero sugiere que otros mecanismos están implicados en este efecto.

En este sentido, el tratamiento con cadmio de neuronas SN56 también aumentó la expresión de la variante AChE-S y disminuyó la expresión de la variante AChE-R, así como aumentó los niveles de proteínas A β , Tau totales y fosforiladas y aumentó la expresión de la enzima GSK-3 β , que está en concordancia con estudios previos (Wang et al., 2009). Sin embargo, el tratamiento con cadmio de las células SN56 silenciadas contra AChE, β APP o GSK-3 β revertió parcialmente la inducción de muerte celular en cada caso, y en el último caso también el incremento en los niveles de las proteínas Tau totales y fosforiladas, lo que evidenció la implicación de estos mecanismos en la inducción de la muerte de neuronas colinérgicas septales. Además, el tratamiento con cadmio de células SN56 silenciadas simultáneamente para AChE, RM1, β APP y GSK-3 β redujo el aumento de la muerte celular producido por el

tratamiento solo con cadmio. Estos datos sugieren que otros mecanismos además de los descritos arriba están implicados en la muerte celular inducida sobre neuronas colinérgicas septales. El bloqueo de los RM1 medió la inducción de los mecanismos descritos que conducen a la generación de muerte neuronal y alteración de la transmisión colinérgica a través de la alteración de las variantes de la AChE, pero otros mecanismos pueden estar involucrados. El tratamiento con cadmio de las células SN56 indujo la generación de ERO y de peroxidación lipídica que conducen a la inducción de muerte celular. La generación de ERO medió la activación de todos los mecanismos descritos en parte a través del bloqueo de los RM1 y éstos, a su vez, a través de la alteración de las variantes de la AChE.

CONCLUSIONES

El cadmio induce una alteración de la transmisión colinérgica y una muerte celular más pronunciada, pero no selectiva, sobre las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, mediada en parte por la inducción de ERO y el bloqueo de los receptores M1 muscarínicos. El bloqueo de los receptores muscarínicos por el cadmio está mediado en parte por la generación de ERO. Por otra parte, estas dos acciones inducen en parte la alteración de las variantes de la AChE, las cuales inducen la sobreexpresión de GSK-3 β y un aumento en las proteínas A β , Tau totales y fosforiladas que dan lugar a la muerte neuronal. Por lo tanto, los efectos observados sobre las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal pueden ser, en parte, responsables de los déficits de aprendizaje observados en la toxicidad del cadmio. Por otra parte, aunque se han encontrado niveles más altos de cadmio en los tejidos cerebrales de los pacientes con EA que en personas sanas y se ha relacionado como un posible factor de riesgo para la EA, todavía no se ha demostrado su implicación. Nuestros resultados podrían apoyar su posible implicación, porque el cadmio alteró los principales marcadores de la EA. Sin embargo, también podrían sugerir

que la toxicidad de cadmio puede compartir algunos mecanismos con la EA que inducen los síntomas que comparten. Se deben desarrollar posteriores estudios con el objetivo de determinar el resto de mecanismos involucrados en la muerte celular más pronunciada observada en las neuronas colinérgicas y también los mecanismos completos por los que la generación de ERO y el bloqueo de RM1 media este efecto, así como para corroborar *in vivo* que este efecto media los trastornos cognitivos observados tras la exposición al cadmio. Estos resultados son de gran interés porque podrían conducir a una mejor comprensión de los mecanismos responsables de producir las alteraciones cognitivas inducidas por el cadmio.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

1. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

El cadmio es un metal pesado que se utiliza ampliamente para la fabricación de distintos productos y se libera durante la incineración de residuos. Tras la exposición, éste se acumula en el organismo, presentando una vida media de 7 a 30 años y origina múltiples efectos tóxicos entre los cuales se encuentran trastornos del aprendizaje y memoria con una sintomatología similar a la enfermedad de Alzheimer, aunque el mecanismo por el cual se inducen estos efectos es desconocido.

Los procesos de aprendizaje y memoria son regulados por el sistema colinérgico del prosencéfalo basal en el sistema nervioso central (SNC), por lo tanto, el bloqueo de la transmisión o la muerte de neuronas colinérgicas en esta región podrían estar relacionados con el deterioro de la memoria inducida por el cadmio. En este sentido, se ha descrito que el cadmio, en otras regiones cerebrales distintas del prosencéfalo basal, bloquea la transmisión colinérgica aumentando la actividad de la enzima acetil colinesterasa (AChE) que degrada el neurotransmisor acetilcolina, y a su vez bloquea receptores muscarínicos, los cuales no sólo son necesarios para mantener la transmisión colinérgica sino también la viabilidad neuronal. También se ha descrito que el cadmio induce la muerte selectiva de neuronas colinérgicas a nivel periférico. Además, se ha descrito que el cadmio, en otras regiones cerebrales, activa la enzima glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK-3 β), induce la fosforilación de proteínas Tau y la formación de proteínas beta amiloideas (A β), las cuales se han relacionado con la inducción de muerte selectiva de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal en la enfermedad de Alzheimer. Por último, se ha mostrado que todos estos mecanismos también son producidos por el bloqueo del receptor muscarínico M1 (RM1) a través de la alteración de las variantes de la AChE.

La enzima acetil colinesterasa, además de su actividad metabólica, se ha descrito que participa en la regulación de diversos procesos neuronales. También, se ha descrito que presenta tres variantes de las cuales dos se expresan a nivel cerebral, que son las variantes S y R, con efectos contrapuestos. El incremento de la expresión de la variante S se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y en concreto con un incremento de la mortalidad de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal en el SNC. En este sentido, se ha descrito que el incremento en la expresión de la variante S incrementa la enzima GSK-3 β , induce la fosforilación de proteínas Tau y la formación de proteínas A β , factores que se ha descrito que son inducidos por el cadmio.

Por otra parte, se ha descrito que las alteraciones cognitivas inducidas por el cadmio están relacionadas con la inducción de estrés oxidativo y el tratamiento antioxidante mejora dichas alteraciones. Se ha descrito que el estrés oxidativo puede inducir muerte neuronal, estimular la producción de proteínas A β , hiperfosforilación de proteínas Tau, activar la enzima GSK-3 β y alterar la actividad de los receptores muscarínicos, por lo que la generación de radicales libres por el cadmio podrían mediar las alteraciones cognitivas descritas a través de estos mecanismos.

Según estos datos, hipotetizamos que el cadmio podría inducir toxicidad selectiva sobre el sistema colinérgico, induciendo alteración de la transmisión colinérgica y la muerte de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal del SNC, lo que podría explicar los efectos descritos del cadmio sobre los procesos de aprendizaje y memoria. Además, hipotetizamos que los efectos descritos sobre la transmisión colinérgica y muerte neuronal pueden ser debidos a la inducción de estrés oxidativo que media en el bloqueo selectivo de los receptores muscarínicos M1, que da lugar a un incremento de la expresión de la variante S de la acetil colinesterasa, la

cual media la inducción de la expresión de la enzima GSK-3 β , induce la fosforilación de proteínas Tau y la formación de proteínas A β , que producen la muerte selectiva de las neuronas colinérgicas.

Para probar esta hipótesis, nuestro objetivo fue evaluar los efectos del cadmio tras 24 horas de exposición sobre:

1- La inducción de muerte neuronal selectiva sobre neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal en cultivos primarios procedentes de esta región.

2- La inducción de muerte neuronal en neuronas colinérgicas de SN56 procedentes del prosencéfalo basal.

3- La transmisión colinérgica y los mecanismos implicados en su regulación, así como la posible participación sobre la viabilidad celular en las neuronas SN56.

4- La inducción de estrés oxidativo, su implicación en la pérdida de neuronas colinérgicas y mecanismos por los que produce este efecto en neuronas SN56.

El interés de este trabajo se centra en aportar nuevos datos sobre la neurotoxicidad inducida por el cadmio, que proporcionan una nueva comprensión de los mecanismos que contribuyen a los efectos nocivos del cadmio sobre la función y viabilidad neuronal, y la posible relevancia del cadmio en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas. Específicamente, el interés del trabajo se centra en aportar nuevos datos de la neurotoxicidad inducida por cadmio sobre el sistema colinérgico del prosencéfalo basal del SNC, que puedan explicar los efectos cognitivos producidos por la exposición al mismo, así como los mecanismos

a través de los que se producen los mismos debido a que el cadmio se ha asociado como un posible factor etiológico de la enfermedad de Alzheimer. Además, los presentes datos son de relevancia para la evaluación del riesgo de este compuesto ya que hasta la actualidad se basa exclusivamente en sus efectos de toxicidad renal.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

El cadmio es un contaminante muy extendido en el medio ambiente, que supone una gran preocupación debido a sus características como son una semivida biológica extremadamente prolongada (aproximadamente 20-30 años en humanos), baja tasa de excreción del cuerpo y almacenamiento predominantemente en tejidos blandos (principalmente, hígado y riñones).

El cadmio es un elemento extremadamente tóxico, con un valor medio de toxicidad aguda oral DL_{50} para ratones y ratas de 100 mg/kg de peso corporal, y por vía inhalada de 500 mg/m³ en ratas y 700 mg/m³ en ratones. Los niveles ambientales han aumentado constantemente debido a su continua movilización antropogénica a nivel mundial. En este sentido, la industrialización progresiva en los países en desarrollo ha conducido a una creciente contaminación por metales pesados incluido el cadmio debido al aumento de la producción (Flora et al., 2008). Cerca de 13.000 toneladas de cadmio se producen anualmente en todo el mundo, principalmente a partir de baterías de níquel-cadmio, pigmentos, estabilizadores químicos, revestimientos metálicos y aleaciones. Aunque las emisiones en el medio ambiente han disminuido notablemente en la mayoría de los países industrializados, el cadmio sigue siendo una fuente de preocupación tanto para los trabajadores de las industrias como para las poblaciones que viven en zonas contaminadas, especialmente en los países menos desarrollados (Govil et al., 2008).

El cadmio es absorbido a través del humo del cigarrillo, alimentos contaminados, las aguas y el aire, teniendo efectos indeseables sobre todos los seres vivos. En este sentido, el cadmio tiene una diversidad de efectos tóxicos incluyendo neurotoxicidad, nefrotoxicidad,

osteotoxicidad, carcinogenicidad, teratogenicidad, toxicidad endocrina y reproductiva. A nivel celular, el cadmio afecta la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y otras actividades celulares. La exposición al cadmio induce alteraciones genómicas a través de mecanismos complejos y multifactoriales, siendo el más importante la interacción del cadmio con el mecanismo de reparación del ADN, la generación de especies reactivas de oxígeno y la inducción de la apoptosis.

A nivel industrial cadmio es peligroso para los trabajadores tanto por inhalación como por ingestión y puede causar intoxicaciones agudas y crónicas. Se ha comprobado que el cadmio contribuye en gran medida a la contaminación de las tierras agrícolas. El cadmio es absorbido selectivamente por ciertos alimentos comestibles, que suponen una fuente de exposición humana al cadmio (Anetor, 2012). La característica más peligrosa del cadmio es que es un tóxico acumulativo, que se almacena a lo largo del tiempo debido a su larga vida biológica (Hideaki et al., 2008). Una vez absorbido se deposita principalmente en el hígado y el riñón, aunque las pruebas actuales sugieren que su peligrosidad a nivel crónico puede ser superada por la genotoxicidad (Anetor, 2012).

La posibilidad de que este metal pudiera causar efectos crónicos en trabajadores industriales fue reconocida con los primeros informes de lesiones pulmonares, óseas y renales en dichos trabajadores publicados a fines de los años 30-40 del siglo XX (Bulmer et al., 1938; Nicaud et al., 1942; Friberg, 1950). En los años sesenta del siglo pasado, el cadmio fue identificado como el principal factor etiológico en la enfermedad de Itai-itai, una afección que afligió a los japoneses residentes en la Prefectura de Toyama expuestos al cadmio a través de su dieta a base de arroz y agua contaminada con cadmio en la cuenca del río Jinzu procedente de una antigua mina de plomo y zinc, y que se caracterizaba por osteomalacia con diversos

grados de osteoporosis, llegando a producirse fracturas óseas por fragilidad y acompañado de severa enfermedad tubular renal.

Después de estos primeros informes de intoxicación grave, se realizaron en todo el mundo una serie de estudios epidemiológicos y experimentales para caracterizar la toxicidad del cadmio y para evaluar los niveles de exposición a los que este contaminante generalizado podría amenazar la salud humana. Estos estudios han demostrado que este metal puede causar una diversidad de efectos tóxicos; las sales de cadmio solubles se acumulan y producen un cuadro de toxicidad que afecta al riñón, hígado, pulmones, hueso, cerebro, testículos, corazón y sistema nervioso central. Además, el cadmio puede causar osteoporosis, anemia, enfisema no hipertrófico, eosinofilia, anosmia y rinitis crónica (Valko et al., 2005). A parte de los efectos citotóxicos directos, el cadmio ha estado implicado en el desarrollo del cáncer y ha sido clasificado como un carcinógeno de tipo I por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC 1993, 2014; Arroyo et al., 2012).

Finalmente, se ha relacionado este metal con la inducción de enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, debido a que induce una sintomatología similar a ambas enfermedades entre la sintomatología general de toxicidad que genera, sin embargo, los mecanismos a través de los cuales se producen dichos efectos no se conocen (Chin-Chan et al., 2015). Además, no se ha podido establecer una relación de causalidad entre la exposición a dicho metal y la inducción de dichas enfermedades debido al largo tiempo que puede pasar entre la exposición y la aparición de la enfermedad y a la ausencia de biomarcadores de inducción temprana de la enfermedad que ayuden a identificar el inicio de la generación de la misma antes de que esta sea clínicamente evidente (Chin-Chan et al., 2015).

En la tabla 1 se describen las declaraciones de peligro que son obligatorias consten en los embalajes de manipulación, transporte y almacenamiento de los materiales que contengan cadmio.

H350	Puede provocar cancer
H330	Mortal en caso de inhalación
H341	Se sospecha que provoca defectos genéticos
H361fd	Se sospecha que puede perjudicar la fertilidad. Se sospecha que puede dañar al feto
H372	Perjudica a determinados órganos por exposición prolongada o repetida
H410	Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos

Tabla 1. Declaraciones de peligro del cadmio GSH (Sistema Globalmente Armonizado de Comunicación y Etiquetado de Químicos).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. CADMIO

El Cadmio fue descubierto en el año 1817 por el químico alemán Friedrich Stormeyer (1776-1835) como impureza de la calamina (carbonato de zinc), de ahí su nombre (del latín cadmia). Es un miembro de los metales de transición del grupo 12, subgrupo IIb (que también incluye el zinc y el mercurio) dentro de los elementos de la Tabla Periódica. El número de registro en el Chemical Abstracts Service (CAS) del cadmio es 7440-43-9.

Está presente en la corteza terrestre en una concentración de 0.1 a 0.5 ppm y comúnmente asociado a minerales de zinc, plomo y cobre. También es un componente habitual del agua oceánica con unos niveles de <5 a 110 ng/L, con mayor concentración en las aguas costeras. La concentración del cadmio en las aguas dulces es generalmente < 1 µg/L.

3.1.1. Propiedades Fisicoquímicas

El cadmio es un metal blando, dúctil, de color blanco plateado o blanco azulado, con un punto de fusión de 321,07°C, y punto de ebullición de 767°C (Nriagu, 1980). El cadmio elemental tiene un número atómico de 48, un peso atómico de 112,4 g/mol, y una densidad de 8,65 g/cm³ a 200°C (Nriagu, 1980). En la naturaleza el cadmio se presenta mayoritariamente con estado de oxidación +2.

El cadmio metálico es esencialmente insoluble en agua, sin embargo, varios de sus compuestos son muy solubles como cloruro de cadmio (CdCl₂), bromuro de cadmio (CdBr₂), yoduro de cadmio (CdI₂), nitrato de cadmio [Cd(NO₃)₂] y sulfato de cadmio (CdSO₄) (Weast,

1986; Budavari et al.,1989). Los compuestos insolubles en agua como el óxido de Cadmio (CdO), el sulfuro de Cadmio (CdS), el carbonato de Cadmio (CdCO₃), el ortofosfato de Cadmio [Cd₃(PO₄)₂], y el fluoruro de Cadmio (CdF₂) (Weast, 1986) pueden solubilizarse en condiciones de fuerte oxidación o en medios ácidos (WHO, 1992).

3.1.2. Fuentes del Cadmio

El cadmio se encuentra en el medio ambiente procedente de erosión y abrasión de suelos y rocas (fundamentalmente rocas sedimentarias, pero también metamórficas como los esquistos negros), y como consecuencia de erupciones volcánicas e incendios forestales (Pacyna y Pacyna, 2001). Es un metal poco frecuente, se encuentra como mineral en la Greenockita (CdS), pero lo habitual es que se encuentre en otros minerales en asociación a sulfuros de zinc y en menos medida como impureza de minerales de plomo y cobre. Se pueden producir aproximadamente 3 Kg de cadmio por cada tonelada de Zn.

Fuentes antropogénicas del cadmio

Las actividades industriales son las principales fuentes de liberación de cadmio a la atmósfera superando a las fuentes de origen natural (ATSDR, 2012). Los primeros usos del cadmio fueron para la fabricación de pigmentos y pinturas en forma de sulfuro de cadmio a finales del siglo XIX, a principios del siglo XX se utilizó en amalgamas dentales y durante la primera guerra mundial como sustituto del estaño. A partir de la segunda guerra mundial el cadmio comenzó a utilizarse en la fabricación de baterías, pigmentos, aleaciones, como anticorrosivo, para electroplateado y revestimiento de metales, y como estabilizante de plásticos, además es utilizado en agricultura como componente de fertilizantes fosforados y

plaguicidas. En la actualidad, y debido a las restricciones de uso, ha disminuido su empleo para la fabricación de baterías níquel-cadmio, pero recientemente ha aumentado su empleo como telurio y sulfuro de cadmio para la fabricación de placas solares, al ser más eficiente, barato y dúctil que el silicio, acogiéndose a la exención de la prohibición de uso del cadmio en la industria de energías renovables (Directiva ROHS del Parlamento Europeo, 2010).

Las principales fuentes de cadmio depositado en los suelos son, la atmosférica y la aplicación directa como fertilizante de fosfatos, aguas residuales y depósitos de lodos. La roca fosfórica, principal materia prima para la fabricación de los fertilizantes fosforados, además de fósforo, contiene cantidades de cadmio que pueden variar de 5 a 500 mg por kilogramo (Alloway y Steinnes, 1999). El cadmio presente en el suelo puede ser absorbido por los vegetales entrando fácilmente en la cadena alimentaria.

Debido a su alta transferencia agua-suelo-plantas, los alimentos contaminados son la primera fuente de exposición a cadmio para la población (Hogervorst, 2007). En la población no fumadora, los alimentos representan aproximadamente el 90% de cadmio absorbido. El cadmio se encuentra presente en la mayoría de los alimentos, pero sus concentraciones varían dependiendo del tipo de alimento y la contaminación externa. Los principales alimentos básicos que contribuyen a la exposición de cadmio son cereales y verduras. Cereales como el arroz, trigo y plantas de tabaco concentran niveles de cadmio de 10-150 µg/kg. Se estima que más del 80% del cadmio consumido a través de los alimentos es de origen vegetal. Las vísceras de animales tales como riñón y hígado pueden presentar altas concentraciones de cadmio debido a que este se concentra en dichos órganos (Olsson et al., 2002). Los alimentos marinos, fundamentalmente los moluscos y crustáceos, también concentran altas cantidades de cadmio. Menos del 10% de la exposición total de la población no fumadora es debida a la inhalación de cadmio atmosférico (Vahter et al., 1996) y a través del agua de bebida (Olsson et al., 2002). Las

ingestas totales diarias de cadmio procedente de todas las fuentes en América del Norte y Europa se encuentran entre 10 y 30 μg de Cd/día. De esta cantidad solo el 10% o menos es absorbido (Järup et al., 1998). En 2009 la autoridad europea de seguridad alimentaria (EFSA) llevó a cabo una evaluación del riesgo de cadmio en los alimentos y estableció una ingesta semanal tolerable (TWI) de 2,5 microgramos por kilogramo de peso corporal. En 2010 la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y el Comité de Expertos de la OMS para los Aditivos Alimentarios (JECFA), establecieron un límite provisional tolerable de ingesta (PTMI) de cadmio mensual de 25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal, un valor guía en el agua de bebida de 3 $\mu\text{g}/\text{l}$ y una concentración en el aire de 5 ng/m^3 (valor medio anual) . La exposición en la dieta promedio actual de cadmio para adultos está cerca de este valor, sin embargo, la exposición de algunos subgrupos, como los niños, vegetarianos y personas que viven en zonas altamente contaminadas, podría superar el TWI (EFSA, 2009)

Históricamente, los niveles de cadmio en el lugar de trabajo han mejorado considerablemente con el reconocimiento de su potencial toxicidad en los seres humanos y el desarrollo de normativas de seguridad e higiene en el trabajo. La vía inhalatoria es la ruta predominante de exposición en ambientes laborales. En la actualidad los niveles permitidos de cadmio en el ambiente laboral son de 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3/8$ horas día/ 40 horas semana (OSHA) y las normas laborales establecen valores desde 2 a 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (WHO, 1992; ATSDR, 1999).

Los niveles de cadmio pueden ser medidos en sangre, orina, pelo o uñas, el nivel de cadmio en orina ha demostrado ser un reflejo adecuado de la cantidad de cadmio en el cuerpo. La cantidad de cadmio en sangre muestra la exposición aguda, por el contrario el nivel de cadmio en orina puede mostrar exposición reciente o antigua.

3.2. METABOLISMO

3.2.1. Absorción

Absorción gastrointestinal

La fuente principal de Cadmio en la población no fumadora es a través de los alimentos contaminados limitándose su absorción gastrointestinal a un 5-10% de la cantidad ingerida. Puede aumentar la absorción de cadmio por deficiencias dietéticas de calcio (Ca) o hierro (Fe), pudiendo alcanzarse en déficit de hierro una absorción del 15 al 20% del cadmio ingerido, y por las dietas bajas en proteínas. En la población general, las mujeres tienen niveles más altos de cadmio que los hombres, debido posiblemente a una mayor absorción del mismo al presentar niveles inferiores de hierro durante la edad fértil. De hecho, las mujeres que presentan bajos niveles en suero de ferritina tienden a duplicar la tasa normal de absorción oral de cadmio.

La absorción intestinal tiene lugar en el duodeno y parte inicial del yeyuno en la zona apical y basolateral de los enterocitos (Andersen et al., 1994). Si el cadmio se encuentra unido a metalotioneínas (Cd-MT) atraviesa el epitelio intestinal y se incorpora a la circulación portal en los capilares sanguíneos de la lámina propia (Sugawara y Sugawara, 1991). Para que esto ocurra, el complejo Cd-MT cruza la membrana apical por zonas permeables de las uniones intercelulares de los enterocitos adyacentes, y también por endocitosis (Tallkvist et al., 2001). Posteriormente es transportado a través de la membrana basolateral por exocitosis o produciendo la muerte del enterocito siendo liberado a los capilares. El cadmio también puede penetrar en el enterocito unido a aminoácidos u oligopéptidos presentes en el epitelio intestinal por endocitosis (Cannon et al., 2001). En relación con el transporte basolateral del cadmio hacia los capilares sanguíneos de la lámina propia se sugiere que el cadmio utiliza la proteína

transportadora de metales divalentes (DMT1) presente en la membrana apical (Arnich et al., 2004). También, se ha propuesto una vía alternativa a través de los transportadores apicales de Zinc (ZTL1) presentes en la membrana apical de los enterocitos (Cragg et al., 2002).

Absorción pulmonar

La vía inhalatoria es la principal vía de exposición ocupacional y de la población fumadora. El cadmio elemental y sus sales tienen baja volatilidad y existen en el aire como partículas finas en suspensión. Cuando se inhala, una fracción de estas partículas se deposita en las vías aéreas o los pulmones, y el resto es exhalado. Las partículas de mayor tamaño (más de 10 μm de diámetro) tienden a depositarse en las vías respiratorias superiores, mientras que las partículas de menor tamaño (aproximadamente 0,1 μm) tienden a penetrar en los alvéolos. Aunque algunas partículas de cadmio de mayor tamaño depositadas en el árbol respiratorio de carácter soluble (cloruro de cadmio y sulfato de cadmio) pueden sufrir una absorción limitada, el sitio principal de absorción es el alvéolo. Según los estudios realizados por Nordberg et al. (1985), sólo un 5% de las partículas $> 10 \mu\text{m}$ de diámetro se depositarán, y hasta un 50% de partículas $< 0.1 \mu\text{m}$ serán depositadas. Entre un 50 y 100% de cadmio depositado en los alvéolos en última instancia será absorbido. Por lo tanto, el tamaño de partícula, que controla la deposición alveolar, es un determinante clave de la absorción de cadmio en el pulmón (Nordberg et al., 1985). Los datos presentados en estudios en animales indican que la retención pulmonar es mayor tras la exposición a corto plazo (5-20% tras 15 minutos a 2 horas de exposición) (Barrett et al., 1947; Henderson et al., 1979; Moore et al., 1973; Rusch et al., 1986). Tras largos periodos de exposición inhalatoria de cadmio, hay menores depósitos en el pulmón (Glaser et al., 1986). La absorción de cadmio en pulmón difiere un poco entre las formas químicas, pero el patrón no se correlaciona con la solubilidad (Glaser et al., 1986; Rusch et al.,

1986).

La comparación de la carga corporal de cadmio en humanos fumadores y no fumadores, indica que la absorción de cadmio de los cigarrillos parece ser superior a la absorción de cadmio en aerosoles observada en estudios en animales (Nordberg et al., 1985). La forma química del cadmio en el humo del cigarrillo es probable que sea similar a la producida por otros procesos de combustión, principalmente aerosoles de óxido de cadmio. La mayor absorción de cadmio del humo del cigarrillo es probable que sea debido al tamaño muy pequeño de partículas en el humo del cigarrillo y una posterior deposición alveolar muy elevada (Nordberg et al., 1985; Takenaka et al., 2004).

3.2.2. Distribución

El cadmio es transportado por la sangre unido a la albúmina y a otras proteínas de mayor peso molecular y distribuido inicialmente al hígado y al riñón, en ambos tejidos induce la síntesis de metalotioneínas una proteína de unión a metales de bajo peso molecular (Goyer, 2008; Klaassen et al., 1999) y tiene una vida media de 17 a 30 años en los seres humanos. El cadmio es acumulado en hígado como Cd-MT y puede ser liberado del hígado y transportado vía sanguínea al riñón, donde es reabsorbido y degradado en los lisosomas de las células de los túbulos renales. Cerca de 50-75% de cadmio retenido se encuentra en el hígado y los riñones.

Los niveles de cadmio en sangre de exposición no ocupacional, y no fumadores son menores de 1 µg/L. El cadmio puede penetrar en el cerebro desde la sangre al pasar la barrera hematoencefálica (BHE) y al cruzar el plexo coroideo (PC) entrando en el fluido cerebro espinal (FCE) y así alcanzar determinadas partes cerebrales (Joker, 2006). Para cruzar la BHE, el

cadmio mimetiza el comportamiento de nutrientes esenciales utilizando transportadores iónicos (Manton et al., 1984). Estudios *in vivo* han demostrado que el cadmio penetra y se acumula en el cerebro de ratas adultas y en desarrollo (Mendez-Armenta y Rios, 2007). El cadmio por vía inhalatoria también es transportado a lo largo de las neuronas olfatorias primarias a sus terminaciones nerviosas evitando la BHE. La vía olfativa, por tanto, debe tenerse en cuenta para la evaluación de riesgos laborales para este metal (Tjälve, 1999; Czarnecki, 2011).

3.3. MECANISMOS DE ACCION

Los mecanismos moleculares de la toxicidad de cadmio no son completamente conocidos. Se ha descrito que el cadmio afecta a la proliferación y diferenciación celular, a la progresión del ciclo celular, a la síntesis de ADN y otras actividades celulares (Aimola et al., 2012). Los resultados obtenidos en estudios con animales han mostrado que el cadmio puede interactuar con transportadores de membrana involucrados en la captura de metales esenciales tales como hierro y zinc en el tracto gastrointestinal, logrando desplazar a estos metales y penetrar a la célula (Bridges y Zalups, 2005). Este mecanismo se produce debido a que el cadmio es capaz de mimetizar a estos cationes divalentes en el sitio de unión de uno o más transportadores de proteínas y/o canales que transportan dichos metales. Así mismo, una de las principales entradas del cadmio a la célula está dada por los canales de calcio, teniendo en cuenta que el cadmio y el calcio tienen un radio iónico similar, el metal puede introducirse libremente por esta vía a las células (Goyer, 2008; Méndez-Armenta, 2001; Flora et al., 2008). La alteración en la homeostasis del calcio intracelular lleva a la célula a una liberación del calcio mitocondrial y retículo endoplásmico, produciendo alteraciones en el metabolismo celular, interfiriendo con vías de señalización dependientes de calcio, con señales de transducción entre las células, dañando a las membranas, bloqueando canales dependientes de voltaje, alterando la

regulación génica y bloqueando la liberación de neurotransmisores (Méndez-Armenta, 2007; Viarengo, 1991; Gutiérrez-Reyes et al., 1998). En este sentido, la liberación de neurotransmisores tales como serotonina y norepinefrina se ve alterada en animales en desarrollo que han sido expuestos a cadmio (Lafuente, 2001; Lafuente, 2003). También, se ha descrito que el cadmio puede modificar el contenido de taurina y ácido gamma aminobutírico (GABA) en el hipotálamo, estriado y corteza prefrontal de ratas en desarrollo (Esquifino, 2001).

El descubrimiento en 1957 de una proteína rica en cisteína unida a cadmio marcó el nacimiento de la superfamilia de polipéptidos de bajo peso molecular de las metalotioneínas (MTs). Los principales metales unidos a las MTs son el zinc, el cadmio, el mercurio y el cobre, con una estabilidad creciente de la unión en el orden mencionado (Kille et al., 1994, Ebadi et al., 1995; Nordberg y Nordberg, 2000; Hidalgo et al., 2001). Debido al importante papel del zinc y cobre como oligoelementos fisiológicos, las funciones de metalotioneína se han asociado a la regulación de estos dos metales. El zinc ha sido identificado como un componente central de más de 300 enzimas involucradas en el metabolismo de las células, así como un elemento estructural esencial en toda una clase de factores de transcripción (Betz y Goldestein, 1986). Otras funciones, atribuidas a las MTs, incluyen el secuestro y la dispersión de iones metálicos en la homeostasis de cobre y zinc, especialmente para el control de los factores de transcripción dependientes del zinc, la protección contra las radiaciones ionizantes, la resistencia a fármacos y mutágenos electrofílicos anticancerosos y la desintoxicación de metales (Hidalgo et al., 1990; Hidalgo y Carrasco, 1998; Nishimura et al., 1992; Aschner et al., 1997). Del mismo modo, todas las isoformas de MTs unidas al zinc son agentes antioxidantes debido a que el grupo zinc-azufre es sensible a los cambios en el estado redox celular. Por lo tanto, las propiedades redox de los complejos Zn-MTs son cruciales para su papel protector contra el efecto citotóxico de las especies reactivas del oxígeno (Sato y Bremner, 1993; Maret y Valle, 1998). Las hormonas,

las citoquinas y los metales inducen las MTs, lo que implica que pueden actuar en la proliferación y diferenciación celular así como en mecanismos de defensa celular (Kille et al., 1994; Aschner et al., 1997). En este sentido, se ha descrito que el cadmio induce la expresión de los genes de las MTs en el hígado y el cerebro de ratones y ratas tras su exposición.

También se ha descrito que el cadmio produce la generación de radicales libres en cerebro y otros órganos con la consiguiente inducción de lipoperoxidación (LPO) (Manca, 1991). En este sentido, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que es capaz de incrementar la LPO por medio de la generación de radicales libres (radical superóxido, radical hidroxilo y radicales del óxido nítrico) (Flora et al., 2008). El cadmio al desplazar al hierro y el cobre, estos iones quedan libres e ingresan al ciclo de Haber Weiss catalizando la reacción de Fenton que causa la generación de radicales libres. Estos efectos tratan de ser detenidos por mecanismos de defensa antioxidante tanto en el cerebro como en otros órganos. Sin embargo, diversos estudios han mostrado que la actividad de los sistemas antioxidantes glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), y superóxidodismutasa (SOD) están disminuidas en presencia de cadmio (Valko et al., 2005; Flora et al., 2008; Antonito et al., 2003), por lo que este efecto es más pronunciado.

La generación de radicales libres por el cadmio afecta a numerosos componentes celulares como el ADN, los lípidos y las proteínas (Figueiredo-Pereira et al., 1998; Rajanna et al., 1990) y puede conducir hacia la inducción de apoptosis y necrosis celular (Kondoh et al., 2002; Risso-de Faverney et al., 2001; Yuan et al., 2013). En este sentido, Li et al. (2000) sugieren que la entrada de cadmio en las células se produce a través del canal calcio voltaje dependiente y regula la expresión del receptor de inositol trifosfato (IP3R1) aumentando la liberación de calcio al retículo endoplásmico. El calcio activa la calpaina e induce la

fragmentación del ADN y la apoptosis. Por otra parte, el cadmio posiblemente activa la 8-caspasa e induce apoptosis. La 8-caspasa directamente activa las caspasas efectoras (caspasa 3 y 7) responsables de muchos de los efectos bioquímicos y morfológicos producidos en la apoptosis. En otro estudio se demostró que el tratamiento de células HL-60 con cadmio dio lugar a la inducción del citocromo C, un potente activador de la caspasa 9, en el citosol. La caspasa 9 es un potente activador de las caspasas efectoras como la caspasa 3. El resultado sugiere que la apoptosis inducida por cadmio es parcialmente causada por la activación de la caspasa 9 desencadenada por el citocromo C (Kondoh et al., 2002). Sin embargo, el cadmio puede inducir apoptosis por alteración de la actividad de varios factores de transcripción sensibles al estrés oxidativo, que son los responsables de la regulación de la expresión de genes apoptóticos (Watkin et al., 2003). Uno de estos factores es el factor nuclear kapa beta (NF-kB) es un importante factor en el balance celular de la muerte/supervivencia celular. Los metales pesados como el mercurio, el arsénico el zinc y el cadmio que tienen gran afinidad por los grupos -SH e inhiben el NF-kB unido al ADN *in vitro* (Shumilla et al., 1998)

También, se ha descrito que el cadmio inhibe la reparación del ADN (Giaginis et al., 2006; Hartwig, 2010), lo que representa una causa de inestabilidad genómica (una condición asociada con tumorigénesis) actuando como un producto químico co-genotóxico (Waisberg et al., 2003). Este mecanismo junto con la generación de radicales libres, la activación de proto-oncogenes, la alteración de la metilación del ADN y la desregulación en la expresión génica se han propuesto como mecanismos que inducen carcinogénesis (Beyersmann y Hechtenberg 1997; Bertin y Auerbeck 2006; Joseph, 2009).

El notable potencial del cadmio para inhibir la reparación del daño del ADN es responsable de su carcinogenicidad (Giaginis et al., 2006). El cadmio es co-mutagénico y

aumenta la mutagenicidad de las radiaciones ultra violeta (UV), la alquilación y oxidación en células de mamíferos. Estos efectos pueden explicarse por la inhibición inducida en varios tipos de reparación del ADN por el cadmio [reparación de la ruptura de las bases (BER), reparación de la escisión de nucleótidos (NER) y reparación incorrecta (MMR)].

El cadmio a bajas concentraciones genera un daño oxidativo que inhibe la reparación de la ruptura de bases del ADN en células de mamífero (Dally y Hartwig 1997; Fatur et al., 2003). En este sentido, la exposición de las células humanas a concentraciones sub-letales de cadmio disminuye la actividad de la enzima 8-oxoguanina ADN N-glicosilasa 1 humana (hOGG1) de forma, tiempo y concentración dependiente, principal responsable de la reparación de la 8-oxoguanina, una forma abundante y mutagénica de la guanina oxidada. El estudio de Bravard et al. (2009) confirma que parte del efecto inhibitorio a baja dosis del cadmio en la actividad de la 8-oxoguanina ADN N-glicosilasa podría atribuirse a la transcripción reducida del gen de la hOGG1 (Youn et al., 2005). Sin embargo, este efecto inhibidor moderado del cadmio sobre la transcripción no puede explicar por completo la disminución sobre la actividad y los niveles de la proteína hOGG1. Estos resultados, junto con el efecto observado de inhibición indirecta de hOGG1 por oxidación, apoyan la hipótesis de que los efectos sobre la vía BER son fundamentalmente la consecuencia del desequilibrio redox celular más que de la interacción directa con las proteínas de dicha vía. Por otra parte, la exposición al cadmio inhibe y modifica algunas proteínas de la vía BER como la formamidopirimidina glicosilasa (Fpg), en la que la sustitución de una cisteína en el zinc localizado en el extremo C terminal de dicha proteína puede inhibir la unión de la misma al ADN para facilitar su labor de reparación (O'Connor, 1993). Con respecto a otras bases, Candéas et al. (2010) demostraron que el cadmio inhibe la reparación del uracilo (U) en el ADN, resultado tanto de la mala incorporación como de la desaminación de la citosina (C). Estas lesiones, como las de los sitios apurínicos-apirimidínicos

(AP), son comunes en cualquier célula y deben ser reparadas constantemente para evitar efectos mutagénicos. Esta consecuencia genotóxica de la exposición al cadmio podría dar lugar a la desregulación de los procesos celulares fisiológicos alterando el patrón de expresión génica, y aumentando la tasa de mutación por otro lado (en el sitio AP), interfiriendo con el control normal del crecimiento y división celular.

Con respecto a la vía NER, el cadmio interfiere con la eliminación de los dímeros de timina después de la irradiación UV, al inhibir el primer paso de esta reparación (Fatur et al., 2003). Además, tanto la asociación como la disociación de proteínas esenciales de la vía NER son alteradas en presencia de cadmio. En este sentido, se ha observado una disminución de los niveles de la proteína nuclear C de xeroderma pigmentoso (XPC) por daño del ADN inducido por la radiación UV-C en cultivos celulares tras la incubación a una concentración no citotóxica de cadmio. Curiosamente, la proteína supresora de tumores p53 también contiene un dominio de unión al zinc, que es esencial para la unión al ADN y la función de dicha proteína en el mecanismo de transcripción. En este contexto, Meplan et al. (1999) demostraron que el cloruro de cadmio altera la conformación de p53 en células MCF7 e inhibe su unión al ADN. Como se ha demostrado que p53 actúa como factor de transcripción para dos genes importantes de la vía NER, como son XPC y P48, el cambio conformacional de p53 inducido por el cadmio, también podría provocar alteración de la vía NER (Adimoolam y Ford, 2002). El cadmio también inhibe la proteína Xeroderma pigmentosum A (XPA) de la vía NER. La capacidad de unión a ADN de XPA se reduce fuertemente tras la intoxicación con cadmio (Hartmann y Hartwig, 1998; Hartwig et al., 2002).

Además, Jin et al. (2003) advirtieron que el cadmio inhibe la vía MMR en extractos de tejidos humanos dejando aproximadamente del 20-50% del ADN sin reparar. El cadmio inhibe

la unión del trifosfato de adenosina y la hidrólisis del complejo MSH2-MSH6 lo que conduce a la propagación de los errores celulares, por lo tanto, los efectos tóxicos del cadmio pueden amplificarse en las células mediante la creación de mutaciones en los genes que inducen más funciones defectuosas. Los estudios también han demostrado que el número de células con rupturas de una sola cadena de ADN y el nivel de daños en el ADN celular fue significativamente mayor en los animales expuestos al cadmio. Las deficiencias heredadas o adquiridas en estos sistemas de reparación pueden iniciar el crecimiento de tumores malignos. Los defectos genéticos y polimorfismos en los genes de los componentes de reparación del ADN (por ejemplo, ERCC1, MGMT, MLH1, MSH2, MSH6 y XRCC4) están fuertemente asociados con el cáncer en humanos (Ford et al., 2000). La alteración consecutiva de la reparación y el daño persistente del ADN dan lugar a la inestabilidad genómica, posiblemente permitiendo la proliferación celular aberrante y / o la apoptosis imperfecta.

Por otra parte, se ha propuesto que tras la exposición al cadmio el organismo adquiere una resistencia celular apoptótica como mecanismo de defensa fundamental contra la proliferación incontrolada de células mutadas o transformadas en el cuerpo. Se espera que la apoptosis que se observa frecuentemente en células expuestas al cadmio tenga una función anti-carcinogénica, pero en este contexto, la muerte celular apoptótica inducida por cadmio puede resultar no tener un carácter completamente protector. En la transformación maligna, algunos estudios sugieren que sólo una fracción de células expuestas en una población mueren por apoptosis, mientras que el resto puede volverse resistente a la apoptosis (Waisberg et al., 2003). Además, se ha demostrado que las células transformadas o adaptadas con cadmio se caracterizan por una mayor resistencia a la apoptosis (Hart et al., 2001; Achanzar et al., 2002), lo que puede hacerlas más propensas a la acumulación de mutaciones y transformación neoplásica. De hecho, la disrupción de la apoptosis se considera crítica en la formación de

tumores y la progresión maligna, y la resistencia adquirida a la apoptosis es un sello general del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000).

3.4. TOXICIDAD

El cadmio es un importante contaminante ambiental y ocupacional que causa daños en diversos órganos (Friberg et al., 1986; Morselt, 1991). Es extremadamente tóxico y presenta efectos biológicos en concentraciones menores que otros metales. Los síntomas de la toxicidad por cadmio dependen de la dosis y el tiempo de exposición, la intoxicación aguda se caracteriza por dolor abdominal agudo, náuseas, vómitos, diarrea, cefalea, vértigo y puede producir muerte por lesión hepática o renal. El nivel sin efecto observable de una dosis única oral se estima en 3 mg de cadmio. Los síntomas de toxicidad crónica incluyen alteraciones respiratorias y cardiovasculares, disfunción renal, alteraciones en el metabolismo óseo y neurotoxicidad. Estos efectos tóxicos incluyen la inducción de degeneración o incluso la transmutación de las células (Zarros et al., 2008).

3.4.1. Toxicidad Renal

El riñón es el órgano crítico en la exposición por largos periodos de tiempo a relativamente pequeñas cantidades de cadmio que pueden contener los alimentos y el agua. La disfunción renal por exposición al cadmio ha sido descrita en múltiples estudios. En este sentido, en el estudio realizado por Järup (2002) sobre 1700 sujetos (de 20 a 80 años) de cuatro áreas de Bélgica con diferentes grados de contaminación por cadmio se confirma una probabilidad del 10% de disfunción tubular cuando la excreción de cadmio excede de 2-3 µg/g de creatinina. Un estudio similar realizado en habitantes de Kalmar (de 20 a 79 años) sugirió un aumento de riesgo de enfermedad renal a niveles relativamente bajos de exposición al

cadmio. La residencia se utilizó como una medida cruda de la exposición, ya que las personas que vivían cerca de las plantas contaminantes de cadmio (plantas que producen baterías de níquel-cadmio) tenían niveles elevados de cadmio urinario en comparación con las personas que vivían más alejadas de las fuentes de cadmio (Hellstrom et al., 2001). Otros estudios han confirmado un aumento de la mortalidad general en personas que viven en áreas contaminadas con cadmio y que presentan altos niveles de cadmio urinario y/o proteinuria tubular (Iwata et al., 1991, 1992).

Diversos estudios indican una relación entre la exposición crónica al cadmio y la nefrotoxicidad. Las primeras etapas de la nefrotoxicidad del cadmio implican cambios específicos en la adhesión de las células proximales, cascadas de señalización celular y respuestas autofágicas que se producen antes del inicio de la necrosis o apoptosis de las células del túbulo proximal (Prozialeck y Edwards, 2012). En el torrente sanguíneo, el cadmio es inicialmente transportado al hígado donde es absorbido por los hepatocitos e induce la síntesis de MT, que se une al cadmio y amortigua sus efectos tóxicos en la célula. Sin embargo, a medida que los hepatocitos mueren, ya sea a través de la rotación normal o como resultado de la lesión de cadmio, el complejo Cd-MT puede ser liberado en el torrente sanguíneo (Jin et al., 1998; Klaassen et al., 2009). Aunque el complejo Cd-MT no es tóxico para la mayoría de los órganos, puede ser filtrado en el glomérulo y tomado por las células epiteliales del túbulo proximal. En esta situación, Cd-MT puede tener el efecto paradójico de facilitar la entrega de cadmio del hígado al riñón, y se ha sugerido que Cd-MT puede mediar en realidad algunos de los efectos tóxicos de cadmio en el túbulo proximal (Klaassen y Liu, 1997), ya que los estudios indican que la tumefacción de las mitocondrias del tejido del túbulo proximal renal es causada por el efecto tóxico del propio Cd-MT durante la reabsorción de Cd-MT (Ohta et al., 2000).

Sin embargo, las evidencias indican que en realidad es cadmio iónico (Cd^{2+}), no Cd-MT, el que daña las células epiteliales de los túbulos proximales (Goyer et al., 1989; Klaassen et al., 2009). Se ha observado que el cadmio no unido por MT renal es liberado en el riñón, y este exceso de cadmio puede producir nefrotoxicidad (Nomiyama y Nomiyama, 1986; Nogawa, 1986), interactuando en las células con las membranas celulares, causando peroxidación lipídica y/o puede desplazar metales esenciales de las MT, privando a las metaloenzimas de cofactores esenciales (Stacey et al., 1980). Además, el hecho de que los animales MT-nulos son sensibles a la lesión del tubo proximal inducida por cadmio proporciona evidencia indiscutible de que la Cd-MT no juega un papel crítico en la mediación directa de los efectos nefrotóxicos de cadmio (Liu et al., 1998).

Un aspecto importante de la disposición de cadmio es que esencialmente todo el cadmio del plasma está unido a proteínas u otras moléculas. El cadmio circulante puede estar estrechamente unido a proteínas de unión de metal específicas, tales como las MT (Klaassen y Liu, 1997; Klaassen et al., 2009), o puede estar asociado de forma libre con moléculas, tales como albúmina, aminoácidos o grupos sulfhidrilo de bajo peso molecular, compuestos tales como el glutatión (GSH) o la cisteína (Bridges y Zalups, 2005; He et al., 2009). Estas interacciones del cadmio con proteínas y compuestos de bajo peso molecular en el plasma han complicado los esfuerzos para identificar los mecanismos moleculares por los cuales el cadmio es tomado por las células epiteliales del túbulo proximal *in vivo*.

Varios estudios para abordar este problema han demostrado que el cadmio puede entrar en las células del túbulo proximal a través de una variedad de mecanismos (He et al., 2009). Como se ha indicado anteriormente, el Cd-MT circulante puede ser filtrado en el glomérulo y captado por el epitelio del túbulo proximal en un proceso que involucra el transporte mediado

con megalina en el borde del cepillo (Squibb y Fowler, 1984; Klaassen et al., 2009). Además, hay pruebas de la captación de conjugados Cd-tiol de menor peso molecular (cisteína y GSH) por las células del túbulo proximal (Bridges y Zalups, 2005). Sin embargo, también es importante notar que la interacción entre el cadmio y los tioles de bajo peso molecular es de una afinidad lo suficientemente baja como para que el cadmio pueda disociarse del tiol y unirse a las moléculas en la superficie celular y, en algunos casos, entrar en la célula. De hecho, hay evidencia de que el cadmio puede ingresar a las células tubulares renales a través de una variedad de canales y transportadores para iones, tales como Ca^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} (Bridges y Zalups, 2005; He et al., 2009). He et al. (2009) han proporcionado recientemente pruebas convincentes de que la familia de transportadores de zinc humanos 8 (ZIP8) juegan un papel especialmente importante en la captación celular de cadmio en el riñón (He et al., 2009). En conjunto, estos hallazgos sugieren que, con patrones típicos de exposición, probablemente numerosos mecanismos contribuyen a la captación de cadmio en el túbulo proximal *in vivo* (Prozialeck y Edwards, 2012).

Independientemente de los mecanismos de captación que están involucrados, es evidente que, con el tiempo, el cadmio puede acumularse en las células epiteliales del túbulo proximal. La visión tradicional ha sido que cuando los niveles de cadmio del tejido exceden una concentración crítica de aproximadamente 150 $\mu\text{g/g}$ de tejido, las defensas intracelulares tales como la MT y el GSH se reducen y las células sufren lesiones y comienzan a morir (Gobe y Crane, 2010; Prozialeck y Edwards, 2012). Basándose en estos estudios, la dosis, la duración, la forma química del cadmio en el tejido renal e intestinal y la vía de exposición del cadmio deben considerarse un factor importante en la evaluación de los efectos crónicos de la administración prolongada de cadmio.

Se ha descrito que los efectos celulares de la toxicidad del cadmio, que comienzan con la formación de vesículas pinocitóticas de la superficie luminal seguida de cambios mitocondriales focales, pueden variar desde un ligero edema hasta la hinchazón (Cherian et al., 1976; Webb y Etienne, 1977; Fowler y Nordberg, 1978; Murakami et al., 1983; Goyer et al., 1984; Vestergaard y Shaikh, 1994; Dorian et al., 1995). Se han observado proteinuria de bajo peso molecular, glucosuria y aminoaciduria en el grupo con dosis alta de cadmio (30, 60 mg/kg) y se observaron cambios histopatológicos en forma de un ligero espesamiento membranoso del glomérulo con proteinuria y glucosuria en los grupos de dosis altas (Ohta et al., 2000). Los cambios morfológicos en lesiones más avanzadas son atrofia, fibrosis intersticial, esclerosis glomerular y necrosis focal.

3.4.2. Toxicidad Ósea

El cadmio se deposita en el hueso en una concentración mucho más baja que la alcanzada en otros órganos como el riñón o el hígado, sin embargo, las concentraciones a partir de las cuales tienen lugar efectos tóxicos son mucho más bajas, se estima que la resistencia ósea ya se encuentra disminuida a una concentración de 0,1 µg/g de peso seco óseo (Ogoshi et al, 1992). Por comparación es necesaria una concentración de 200 µg/g para producir daño renal (Friberg et al, 1986). La toxicidad ósea se ve incrementada en mujeres en asociación a otras condiciones como la malnutrición, el embarazo, la lactancia o la ooforectomía (Nogawa, 1981).

Distintos estudios han encontrado que la exposición a largo plazo de cadmio en los seres humanos produce un aumento de la fragilidad esquelética y la disminución de la densidad mineral ósea, si bien en otros estudios se ha demostrado que la pérdida de calcio por parte del hueso aparece a bajas concentraciones y es una respuesta precoz. En los estudios de cultivos de tejido óseo, el cadmio a bajas concentraciones actúa directamente sobre las células óseas para

provocar tanto la disminución de la formación ósea como el aumento de la resorción ósea. (Bhattacharyya, 2009). En un estudio, se examinó la asociación entre dosis bajas de cadmio y la densidad mineral ósea en individuos expuestos medioambientalmente y ocupacionalmente en las comunidades de Fliseryd, Oskarshamn y Linköping (un total de 1064 sujetos de 16 a 80 años) de Suecia. Los resultados mostraron que incluso con un bajo nivel de exposición al cadmio, este puede conducir a la osteoporosis (Alfvén et al., 2000).

Hay que tener en cuenta que la sensibilidad de las células a los efectos del cadmio está relacionada en primer lugar con la capacidad de captación y los niveles de acumulación celular. Debido a que el cadmio es un metal no esencial, la existencia de sistemas de transporte de membrana específicamente dedicados a la captación celular de cadmio es improbable y generalmente se cree que el cadmio puede usar mecanismos de transporte para metales esenciales. Se ha demostrado que los canales de calcio dependientes del voltaje son responsables de la captación de cadmio en las células renales, pituitarias y hepáticas (Hinkle et al., 1987; Endo et al., 2002). Además, el cadmio inhibe la actividad de la enzima 1-hidroxicolecalciferol hidroxilasa, responsable del metabolismo en el riñón que convierte la 25-(OH) D3 a la 1,25-(OH) D3, que es la forma activa de la vitamina D3. La presencia en el intestino de la forma activa de la vitamina D3 es esencial para la absorción de iones de calcio (Chertok et al., 1981).

Hay dos mecanismos propuestos por los cuales el cadmio es capaz de alterar la función del metabolismo óseo. Un mecanismo es indirecto, por lo que el daño del cadmio en el riñón o los órganos gastrointestinales produce un efecto secundario sobre el hueso (Kjellström, 1992). Alternativamente, el cadmio puede actuar directamente sobre los osteoclastos o los osteoblastos estimulando la resorción ósea o inhibiendo la formación ósea, respectivamente, un mecanismo

podría ser el bloqueo de la actividad de los osteoblastos y la liberación de PGE2 que activaría la acción de los osteoclastos (Regunathan et al., 2003; Coonse et al., 2007; Bodo et al., 2010). Coonse (2007) advirtió que la exposición al cadmio puede afectar directamente a los osteoblastos induciendo la muerte apoptótica mediante la activación de caspasa-3 (Conse et al., 2007). Puesto que la apoptosis es un componente integral de la remodelación ósea, la interrupción de las cascadas de señalización apoptótica en los osteoblastos puede contribuir a la pérdida ósea neta, lo que conduce a una enfermedad de los huesos (Xing y Boyce, 2004).

Una variedad de cascadas de señalización está implicada en la capacidad del cadmio para interrumpir la función celular, incluida la apoptosis (Thévenod, 2009). Se estima que dos vías de señalización se activan en respuesta a la exposición al cadmio en varios tipos de células que son la vía de la proteína quinasa C (PKC) y la proteína quinasa regulada por señal extracelular (ERK) (Låg et al., 2005; Martin et al., 2006; Kalariya et al., 2009; Mantha y Jumarie, 2010). Tradicionalmente, ERK se considera generalmente una vía de proliferación celular con una capacidad para proteger las células contra la apoptosis (Santos et al., 2007; Martin et al., 2009). Sin embargo, estudios recientes indican que la activación de ERK puede conducir a la señalización de la muerte celular (Martin et al., 2006, 2009; Rasola et al., 2010). Martin et al. (2006) informaron que la exposición al cadmio conduce a la activación sostenida de ERK durante varios días y finalmente a la apoptosis mediante la activación de caspasa-3 y -8 en células de riñón embrionario humano HEK293.

La exposición a cadmio también se ha relacionado con la vía de la PKC, que es activada en células de riñón de rata y de riñón humano tras exposición al cadmio (Låg et al., 2005). Además, se ha demostrado que la PKC regula negativamente la activación sostenida de ERK en células HEK, haciendo que el ERK activado sea regulado negativamente cuando está

presente PKC fosforilada (Martin et al., 2009). Las vías ERK y PKC orquestan muchas funciones celulares más allá de la muerte y supervivencia celular, incluyendo el desempeño de un papel en la regulación compleja de la formación, maduración y diferenciación de osteoblastos ya sea reprimiendo o estimulando la expresión de genes osteoblásticos clave (Chen et al., 2008; Prouillet et al., 2004; Addison et al., 2007; Nakura et al., 2011; Zhang et al., 2011).

3.4.3. Toxicidad Pulmonar

El pulmón también se considera como uno de los órganos diana de la toxicidad por cadmio. El cadmio entra en el pulmón a través del polvo doméstico, el tabaquismo y/o la exposición ocupacional (Hogervorst et al., 2007). La principal fuente de intoxicación de cadmio por inhalación es el humo del cigarrillo. El pulmón humano reabsorbe del 40-60% del cadmio en el humo del tabaco (Elinder et al., 1976; Godt et al., 2006). Se ha descrito que los trabajadores expuestos a vapores que contienen cadmio desarrollan síndromes de dificultad respiratoria aguda (Barbee y Prince, 1999). La inhalación causa estrés respiratorio y daña el tracto respiratorio. El enfisema, la anosmia y la rinitis crónica se han relacionado con altas concentraciones de cadmio en el aire contaminado. Lampe et al. (2008) examinaron los efectos potenciales de la exposición al cadmio en la función pulmonar utilizando un grupo de 96 hombres que se sometieron a pruebas de función pulmonar entre 1994 y 2002. Estos autores encontraron una reducción del volumen espiratorio forzado en un segundo (un reflejo de la función pulmonar) asociado con el aumento del cadmio urinario entre los que fumaron (Sarkar et al., 2013).

El cadmio puede inducir la apoptosis en líneas de células epiteliales de pulmón de rata como un posible mecanismo subyacente a la inducción de especies reactivas de oxígeno (ERO).

Esta conclusión se basa en el hecho de que la exposición de estas líneas de células a 20 μM de cloruro de cadmio durante 24 horas dio lugar a un aumento de cuatro veces del grupo GSH oxidado (glutathion disulfuro: GSSG), alterando así la homeostasis del GSH. Se sabe que el cadmio (10-50 μM durante 1-3 días) disminuye la expresión de la proteína del regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística en las células epiteliales de las vías respiratorias humanas (Calu3) y la consiguiente disminución del transporte de cloruro en la célula (Rennolds et al., 2010; Nair et al., 2013).

Además, el cadmio ha demostrado causar estrés oxidativo pulmonar, enfisema e inflamación persistente de las vías respiratorias en modelos de ratas que reflejan las condiciones observadas en pacientes con EPOC. Las ratas Sprague-Dawley que recibieron cadmio nebulizado por inhalación (0,1% CdCl_2 en NaCl al 0,9%) durante una sola exposición de 1 hora mostraron un aumento agudo de GSSG en su líquido de lavado broncoalveolar (BALF), que se equilibró con un aumento simultáneo de GSH. Los grupos de animales que sufrieron exposición repetida a cadmio (1 hora durante 35 semanas) mostraron un aumento progresivo de BALF-GSH, lo que está de acuerdo con los hallazgos observados en pacientes con EPOC (Kirschvink et al., 2006). El factor de transcripción antioxidante universal NRF2 ha sido recientemente implicado en una amplia gama de respuestas involucradas tanto en la iniciación como en la progresión de las lesiones pulmonares causadas por el tabaquismo (Tuder y Petrache, 2012).

Diversos estudios también han demostrado el papel del cadmio en el cáncer de pulmón en los seres humanos. Según Verougstraete et al. (2003), los estudios longitudinales han demostrado que los trabajadores expuestos a cadmio o a los compuestos de cadmio están en mayor riesgo de cáncer de pulmón. En otro estudio poblacional de exposiciones ambientales al cadmio se demostró una asociación positiva entre los niveles de cadmio urinario de 24 horas

(duplicación de la excreción) y el cáncer de pulmón y el riesgo de cáncer total (Nawrot et al., 2006).

3.4.4. Toxicidad Hepática

Tras la absorción del cadmio por vía gastrointestinal o pulmonar, éste pasa a la circulación sistémica, y se distribuye a los órganos diana. Gran parte del cadmio absorbido en el intestino pasa primero al hígado por medio de la circulación portal, ligada principalmente a la albúmina, donde se recoge de los capilares sinusoidales de los hepatocitos. El transporte del cadmio a los hepatocitos se produce por un proceso de dos fases, que implica la unión a la membrana plasmática después de la internalización (Souza et al., 1997; DelRaso et al., 2003), los transportadores de membrana presentes en la membrana plasmática sinusoidal desempeñan un papel importante en la segunda fase. Hay algunos informes que involucran transportadores de membrana sinusoidal específicos como DMT1, ZIP8 y ZIP14 que participan en la captación de cadmio en hepatocitos (Liuzzi et al., 2006; Fujishiro et al., 2009). En el hepatocito, el cadmio forma complejos con péptidos pequeños y proteínas a través de grupos sulfhidrilo, incluyendo GSH o la familia de proteínas de unión a metal de alta afinidad MT-I y MT-II (Arroyo et al., 2012). Las MT se unen al cadmio en el citosol hepático y lo hace "inerte". Por lo tanto, las MT son beneficiosas para el hígado. Sin embargo, el complejo Cd-MT es nefrotóxico y se ha propuesto como responsable de la intoxicación crónica por cadmio (Klaassen y Liu, 1997).

Se ha propuesto que la hepatotoxicidad aguda implica dos vías, una para el daño inicial producido por los efectos directos del cadmio y la otra por la lesión posterior producida por la inflamación. La lesión primaria parece ser causada por la unión del cadmio a grupos sulfhidrilo en moléculas críticas en las mitocondrias. La inactivación del grupo tiol provoca estrés

oxidativo, la transición de permeabilidad mitocondrial y la disfunción mitocondrial. Aunque, el cadmio puede dañar hepatocitos directamente, hay razones convincentes para creer que la lesión hepatocelular se produce *in vivo* como resultado de la isquemia causada por el daño a las células endoteliales. Se cree que la lesión secundaria por la exposición aguda al cadmio se produce por la activación de células de Kupffer y una cascada de eventos que implican varios tipos de células hepáticas y un gran número de mediadores inflamatorios y citotóxicos (Rikans y Yamano, 2000).

Se han postulado varios mecanismos para la hepatotoxicidad inducida por cadmio. La lesión hepática parece estar asociada con la unión de grupos sulfhidrilo, implicando proteínas de membrana, proteínas citoplasmáticas y enzimas. Además, el cadmio es un metal no redox que indirectamente puede causar estrés oxidativo por el agotamiento de los niveles celulares de GSH. También compite con metales esenciales, como zinc, selenio, cobre y calcio (Martelli et al., 2006), que interfieren con diversos procesos celulares como el transporte de membranas y el metabolismo energético. Además, afecta a varias funciones celulares, tales como actividades enzimáticas, sistemas de reparación de ADN, estado redox de la célula y transducción de señales (Van Kerkhove et al., 2010). El cadmio también modifica la adhesión célula-célula desmontando el complejo E-cadherina/beta-catenina (Bruscalupi et al., 2009). La producción de mediadores inflamatorios y moléculas de adhesión, la homeostasis de metales esenciales, la inactivación de los grupos sulfhidrilo y el estrés oxidativo, fueron los principales mecanismos atribuidos a la lesión hepática inducida por cadmio.

Estudios previos demuestran que las células de Kupffer activadas, liberan una serie de mediadores inflamatorios (ERO, óxido nítrico y citoquinas). Se ha descrito que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleuquina-1beta (IL-1 β) estimulan la expresión de

moléculas de adhesión intercelular-1 (IMAC-1), las moléculas de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), la E-selectina, la P-selectina y la B2-integrina en el hígado (Mousa, 2004), las cuales inician una cascada de respuestas celulares y humorales que conducen a inflamación y daño hepático secundario durante la hepatotoxicidad inducida por el cadmio (Yamano et al., 2000).

La exposición al cadmio perturba la homeostasis de diversos metales esenciales y, recíprocamente, los efectos del cadmio dependen del estado corporal de los metales esenciales como el hierro y el zinc (Moulis, 2010). La función de muchas metaloproteínas depende en gran medida de su interacción con un metal, usualmente uno de transición, tal como cobre, hierro y zinc. De esta manera, la sustitución de metales esenciales por cadmio es propuesta como el principal mecanismo molecular de hepatotoxicidad cadmio (Arroyo et al., 2012).

El cadmio también se une a los grupos sulfhidrilo con mayor afinidad que los grupos fosfato, cloruro, carboxilo o amino. La importancia de las reacciones del grupo sulfhidrilo a la hepatotoxicidad inducida es, en parte, la protección proporcionada por las MT y los GSH, compuestos ricos en residuos de cisteína (Rikans y Yamano, 2000). La inactivación de tioles proteicos y no proteicos podría también producir toxicidad al interrumpir el estado redox intracelular, lo que a su vez podría afectar a una serie de procesos biológicos importantes. El estrés oxidativo, definido como el estado de desequilibrio entre las concentraciones de ERO y el mecanismo de defensa antioxidante, contribuye al desarrollo de daño hepático.

3.4.5. Toxicidad para la Reproducción

La exposición al cadmio se ha relacionado con una amplia gama de efectos perjudiciales

en la función reproductiva de mamíferos. En virtud de su capacidad demostrada de alterar los índices de esteroidogénesis ovárica y placentaria, lo que afecta negativamente a la reproducción normal, el cadmio se ha añadido a la lista de sustancias químicas disruptoras endocrinas reconocidas (Chedrese et al., 2006).

Se ha descrito que el cadmio altera la biosíntesis de la progesterona, una hormona que está inexorablemente ligada al ciclo ovárico normal y al mantenimiento del embarazo. Por lo tanto, se ha demostrado que el cadmio ejerce efectos significativos sobre la morfología de los ovarios y el tracto reproductivo. Además, la exposición al cadmio durante el embarazo humano se ha relacionado con la disminución del peso al nacer y el parto prematuro, debido a los niveles de cadmio placentario resultante de la exposición materna a desechos industriales o humo de tabaco, asociado con biosíntesis de progesterona disminuida por el trofoblasto placentario (Miceli et al., 2005).

El retraso de la proliferación y el desarrollo trofoblástico, la necrosis placentaria y la supresión de la biosíntesis de esteroides, y el manejo alterado de los metales esenciales por la placenta, contribuyen al retraso de la implantación y posible pérdida precoz del embarazo. El cadmio se ha demostrado que se acumula en los embriones desde la etapa de cuatro células en adelante, y una mayor exposición a la dosis inhibe la progresión a la fase de blastocisto, y puede causar degeneración y descompactación de los blastocistos tras la formación, con apoptosis y descomposición de la adhesión celular (Thompson y Bannigan, 2008).

La concentración de cadmio en el ovario aumenta con la edad, y se ha asociado con el fracaso de la progresión del desarrollo de ovocitos y la falta de ovulación. Un mecanismo adicional por el cual la ovulación podría hacerse ineficaz es el fracaso de la recogida del oocito

por los cilios tubáricos debido a la mala expansión del complejo oocito-cúmulo y la mala expresión de las moléculas de adhesión celular (Thompson y Bannigan, 2008).

En el cultivo de células de mamíferos, el cadmio induce la expresión de genes diana de estrógenos, desencadena la activación de cinasas citoplasmáticas y promueve la proliferación de líneas celulares sensibles a los estrógenos (Zang et al., 2009), sugiriendo que el cadmio promueve una conformación agonista del receptor estrogénico (ER) y activa la señalización de estrógenos tanto genómica como no genómica (Fechner et al., 2011).

Las mujeres tienen un mayor riesgo de anomalías reproductivas asociadas con la exposición, como se demostró en numerosos estudios, pero la exposición al cadmio también perjudica la función testicular. Los mecanismos de los efectos tóxicos del cadmio en los testículos incluyen el daño al endotelio vascular, las células de Leydig y Sertoli, las conexiones intercelulares, la inducción del estrés oxidativo, los mecanismos de defensa antioxidantes deteriorados y la severidad de la respuesta inflamatoria, lo que da lugar a cambios morfológicos y funcionales, como la inhibición de la síntesis de testosterona y el deterioro de la espermatogénesis (Benoff et al., 2009; Taha et al., 2013). El cadmio también interfiere con la función de la próstata, que altera su actividad hormonal, la secreción y perjudica la fertilidad en los hombres (Sarkar et al., 2013). Diversos estudios indican que fumar cigarrillos aumenta tanto en el plasma seminal como a nivel plasmático los niveles de cadmio, indicando también que el tabaquismo se asocia con una disminución del tamaño del testículo (Jurasovic et al., 2004), aumento de los niveles séricos de hormona reproductiva y disminución de la concentración espermática (Chia et al., 1994) y motilidad (Telisman et al., 2000).

3.4.6. Neurotoxicidad

Neurotoxicidad en el desarrollo por cadmio

La neurotoxicidad en el desarrollo relaciona alteraciones en el comportamiento, neuroquímicas, neurohistológicas, y/o alteraciones morfológicas del SNC sucedidas en los descendientes de las madres expuestas durante la gestación y la lactancia (Lazarini et al., 2001). La neurotoxicidad del cadmio es mayor en recién nacidos que en adultos probablemente debido a la inmadurez de la BHE, permitiendo que éste pase con más facilidad al sistema nervioso (Wong, 1982), lo que conduce a cambios neuropatológicos tales como edema cerebral, piconosis, hemorragias, y necrosis en corteza parietal, cerebelo, putamen y núcleo caudado (Méndez-Armenta, 2001). Datos similares fueron reportados en la autopsia de un niño de 2 años que presentó una elevada concentración de cadmio en el cerebro (Provias, 1994). Sin embargo, pocos estudios se han realizado para determinar el daño neurológico. Este sentido, Thatcher et al. (1982) describieron en un estudio epidemiológico hecho en escolares, una asociación entre los niveles altos de cadmio en el cabello y la dificultad en el aprendizaje, hiperactividad y cambios conductuales, mientras que Hart et al. (1989) encontraron que la exposición ocupacional al cadmio estaba asociada con disminución en la atención, velocidad psicomotora, aprendizaje asociativo y memoria.

El mecanismo por el que se producen estos efectos no se conoce, pero se sabe que los neurotransmisores en el sistema nervioso inmaduro pueden actuar como factores tróficos que median procesos durante el desarrollo tales como diferenciación y proliferación celular. Además, estudios más recientes demuestran que los neurotransmisores también pueden mediar la dirección de migración neuronal y el crecimiento axonal durante la formación de circuitos neuronales (Ruediger y Bolz, 2007). Neurotransmisores tales como catecolaminas o la

acetilcolina aparecen en el embrión de animales vertebrados e invertebrados incluso antes de que las neuronas se hayan diferenciado (Pendleton et al., 1998). Muchos neurotransmisores cambian su papel funcional en el SNC durante el desarrollo. La misma molécula puede ser crucial para la diferenciación, crecimiento neuronal y el establecimiento de las redes neuronales en el SNC inmaduro, mientras que en el SNC maduro cambia su función hacia un papel modulador de la comunicación sináptica entre neuronas (Herlenius y Lagercrantz, 2001). En este sentido, se asume que los neurotransmisores monoaminérgicos juegan un papel durante el desarrollo, definido como “morfogenético” (Buznikov et al., 1996; Levitt et al., 1997; Nicotra y Shatten, 1990; Nicotra y Senatori, 1989). Por lo tanto, una alteración en los niveles de alguno de los neurotransmisores puede modificar el desarrollo de los diferentes sistemas de neurotransmisores (Lauder, 1985; Lakshmana y Raju, 1994). En este sentido, se ha descrito que el cadmio es capaz de alterar los niveles de diferentes tipos de neurotransmisores (Esquifino, 2001), por lo que éste podría ser uno de los mecanismos implicados. También se ha descrito que el cadmio puede afectar a las síntesis y reparación del ADN, puede alterar el metabolismo del calcio y otros metales esenciales, puede generar ERO y alterar los mecanismos de muerte celular programada que son esenciales en los procesos de desarrollo (Méndez-Armenta y Rios, 2007), por lo que cualquiera de estos mecanismos puede contribuir a los efectos observados.

En el sistema nervioso, las MTs I y II están presentes en astrocitos, células endoteliales, células endimarias y oligodendroglia, mientras que MT III está presente en las neuronas (Nishimura et al., 1992; Nishimura, 1996; Ebadi et al., 1996; Aschner et al., 1997). La proteína MT-III específica del cerebro posee una actividad inhibidora del crecimiento de células neuronales que no puede ser imitada por las otras isoformas de las MTs (Palmitier et al., 1992; Kille et al., 1994; Nishimura et al., 1992). El cadmio altera la expresión de las isoformas de las MTs. Los niveles de cadmio y su distribución a nivel cerebral van determinar la expresión de

las isoformas MT-I y III en diferentes etapas de desarrollo (Choudhuri et al., 1996). Esta modificación de la expresión de las MTs puede también ser la causa de las alteraciones en el desarrollo y de las diferencias de neurotoxicidad observadas entre el desarrollo y el adulto.

Efectos cognitivos

El cadmio atraviesa la BHE, se acumula en el cerebro (Gutiérrez-Reyes et al., 1998) y produce alteraciones en los procesos de aprendizaje y memoria similares a las observados en la enfermedad de Alzheimer (EA) (Tabla 2 modificado de Wang y Du, 2013). En este sentido, se ha sugerido que el cadmio es un posible factor etiológico de enfermedades neurodegenerativas, como la EA (Jiang et al., 2007). Sin embargo, el mecanismo a través del cual se producen dichas alteraciones no se conoce.

Las neuronas colinérgicas y sus proyecciones están ampliamente distribuidas en todo el SNC con un papel esencial en la regulación de muchas funciones vitales, como el aprendizaje, la memoria, la organización cortical del movimiento y el control del flujo sanguíneo cerebral (Mesulam et al., 2002). La región del prosencéfalo basal es una de las regiones colinérgicas centrales más importantes (Voytko, 1996), cuyas neuronas colinérgicas proyectan sus axones a lo largo de la formación del hipocampo y el neocórtex y regulan los procesos de aprendizaje y memoria (Ward y Hagg, 2000). Así, el bloqueo de la transmisión colinérgica o la pérdida de neuronas colinérgica en esta región, como ocurre en la EA, podrían relacionarse con el deterioro que el cadmio induce sobre los procesos de aprendizaje y memoria, entre otras acciones (Andersson et al., 1997). De hecho, la gravedad del déficit de memoria en la EA está fuertemente correlacionada con el grado de pérdida de células colinérgicas (Bierer et al., 1995). En este sentido, el cadmio inhibe la actividad de la colina acetil transferasa (ChAT) (Dwivedi,

1983), reduce la liberación de acetilcolina neuronal (Alberts et al., 1985; Hayashi y Takayama, 1978) y altera la actividad de la AChE (Gkanti et al., 2014), pudiendo bloquear la transmisión colinérgica. Además, se ha descrito que el tratamiento con cadmio induce una disminución significativa dosis-dependiente de las células colina acetiltransferasa positivas (neuronas motoras) en los cuernos ventrales de la médula espinal fetal humana, mientras que no se observa pérdida neuronal en el ganglio de la raíz dorsal (Sarchielli et al., 2012), lo que sugiere una acción selectiva sobre el sistema colinérgico a nivel periférico.

El mecanismo por el que se produce esta selectividad tóxica sobre las neuronas colinérgicas es desconocido, pero podría estar relacionado con los efectos del cadmio sobre los niveles de acetilcolina (ACh), por alteración de las actividades de la ChAT o la AChE. También este efecto podría deberse a una alteración de la expresión génica de las variantes de la AChE. En este sentido, diferentes estudios han indicado que la AChE tiene funciones alternativas no relacionadas con la neurotransmisión colinérgica (Silman y Sussman, 2005; Soreq y Seidman, 2001) o su actividad catalítica (Dori et al., 2005; Grisaru et al., 2006). La AChE existe como diferentes variantes derivadas del corte y empalme alternativo de la secuencia del ARN mensajero, principalmente las variantes AChE-S y AChE-R (Campanari et al., 2014). La variante sináptica AChE-S (también llamada AChE-T con "T" que indica cola) es la variante principal expresada en el sistema nervioso (Evron et al., 2007). La sobreexpresión de la AChE-S está relacionada con la inducción de neurodegeneración (Birikh et al., 2003) y muerte celular por apoptosis y necrosis (Greenberg et al., 2010; Toiber et al., 2009). Por otra parte, se ha atribuido un papel neuroprotector a la variante AChE-R en la degeneración neuronal dependiente del envejecimiento, así como en neuropatologías, como la EA inducida por proteínas A β (Berson et al., 2008).

También, se ha descrito que el cadmio activa la enzima GSK-3 β (Wang et al., 2009), aumenta la producción de proteína A β a partir de la proteína precursora beta amiloidea (β APP) (Li et al., 2012; Smedman et al., 1997) y la formación de filamentos de Tau (Jiang et al., 2007), en diferentes regiones cerebrales diferentes del prosencéfalo basal. Estos efectos se han relacionado con la inducción de la muerte celular en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y la EA (Hawkes et al., 2005; Kar et al., 2004; Zheng et al., 2002). Además, el cadmio es capaz de bloquear receptores muscarínicos en cerebro de rata (1-10 μ M) *in vivo* (Hedlund et al., 1979) e *in vitro* (50-100 μ M) (Hedlund y Bartfai, 1979), y se ha descrito que bloquea selectivamente los receptores muscarínicos M1 de los anillos aórticos en ratas macho, pero no los receptores muscarínicos M2 y M3 (Bilgen et al., 2003). Se ha descrito que el bloqueo del RM1 induce deterioro de la memoria en ratas y seres humanos que imita el déficit de memoria observado en la EA (Anagnostaras et al., 2003; Atri et al., 2004) e induce muerte celular (Graham et al., 2013). Por lo tanto, estos efectos podrían mediar la toxicidad selectiva del cadmio sobre las neuronas colinérgicas y ser responsables de los déficits de aprendizaje y memoria, así como los síntomas observados en la toxicidad de cadmio similares a los descritos en enfermedades neurodegenerativas.

Se ha observado que la estimulación de los receptores colinérgicos muscarínicos M1 con agonistas da como resultado el bloqueo de GSK-3 β (Fisher, 2012; Lahmy et al., 2013), el procesamiento de la proteína precursora beta-amiloidea a productos no amiloidogénicos, una disminución en la fosforilación de proteínas Tau y reducción del deterioro cognitivo en ratones transgénicos. (Graham et al., 2013; Pavia et al., 1998). Corroborando estos hallazgos, la delección de RM1 conduce a un aumento en la generación de A β y la formación de placas amiloides en un modelo de ratón de EA (Davis et al., 2010), una reducción en la actividad de

ChAT (Park et al., 2004), y la inducción de la patología Tau (Fisher, 2012). El receptor muscarínico M1 también ha demostrado desempeñar un papel esencial en la expresión de las variantes de la AChE. En este sentido, los antagonistas del receptor M1 disminuyen los niveles de ARNm de AChE-R (Salmon et al., 2005). Por lo que el bloqueo del receptor muscarínico M1 por el cadmio podría mediar estos mecanismos.

Además, la sobreexpresión de AChE-S está relacionada con la neurodegeneración a través de la activación de GSK-3 β , Bax y caspasas (Birikh et al., 2003). GSK-3 β se asocia con el deterioro cognitivo y la muerte neuronal (Bhat et al., 2004; DaRocha-Souto et al., 2012), que se invierte por inhibición de la GSK-3 β o por la inhibición o silenciamiento de la AChE. Por otra parte, la sobreexpresión de AChE-S se ha observado en la EA y mostró una correlación positiva con la hiperfosforilación de las proteínas Tau (Toiber et al., 2009). Mientras la AChE-S facilita la formación de placa amiloideas, la AChE-R las inhibe (Berson et al., 2008; Berson y Soreq, 2010). Además, se ha descrito que las proteínas A β reducen la actividad de la ChAT (Li et al., 2013), por lo que la sobreexpresión de AChE-S podría reducir indirectamente la actividad de la ChAT a través del aumento de la producción de proteínas A β . Por lo tanto, la toxicidad selectiva inducida por el cadmio sobre el sistema colinérgico podría estar producida a través de bloqueo de RM1 a través de la alteración de las variantes de la AChE.

Por otra parte, los déficits cognitivos descritos tras la exposición a cadmio han sido también relacionados con la inducción de estrés oxidativo y el tratamiento antioxidante mejora estos déficits (Gonçalves et al., 2010). Además, se ha descrito que el estrés oxidativo puede inducir la muerte celular en las neuronas colinérgicas septales (Traver et al., 2005), así como cambios en la expresión de las variantes de la AChE (Bond et al., 2006). Se ha descrito que el

cadmio puede inducir estrés oxidativo debido a un aumento de la formación de ERO, el agotamiento de las defensas antioxidantes, y la disminución de la expresión de las enzimas antioxidantes mediadas por alteración del regulador maestro de las rutas de estrés oxidativo NRF2/HO-1 (Méndez-Armenta y Rios, 2007). Además se ha descrito que el estrés oxidativo puede alterar la expresión de las variantes de la AChE, la producción de proteínas beta-amiloideas y Tau, la activación de la enzima GSK-3 β y la actividad de los receptores muscarínicos (Bond et al. 2006; Giraldo et al., 2014; Rojo et al., 2008; Tamagno et al., 2005; Wang et al., 2009). Por lo cual, este efecto también podría mediar los mecanismos comentados en la toxicidad selectiva del cadmio sobre el sistema colinérgico y la alteración de los procesos cognitivos.

Autor-año	Grupo	Expuestos- Control (n)	Medición exposición	Vía exposición	Efecto
Adams RG, 1961	Trabajadores varones	106E/84C	-	Ocupacional	Anosmia
Pihl RO, 1977	Niños	31E/22C	Cd en pelo	Vida diaria	Dificultad aprendizaje e hiperactividad
Capel ID, 1981	Niños	73E/44C	Cd en pelo	Vida diaria	Dislexia, trastornos aprendizaje
MNusiol A, 1981	Trabajadores	49E	Cd en orina	Ocupacional	Polineuropatía
Thatcher RW, 1982	Niños	149	Cd en pelo	Vida diaria	Efectos en cociente intelectual verbal
Struempfer RE, 1985	Jóvenes	40	Cd en pelo	Vida diaria	Dificultad comportamiento
Marlowe M, 1985	Niños	69	Cd en pelo	Vida diaria	Comportamiento no adaptado en clase, alteración desarrollo del comportamiento, disminución capacidades visomotoras
Hart RP, 1989	Trabajadores varones	31E	Cd en orina	Ocupacional	Disminución atención, memoria y velocidad psicomotora
Bar-Sela S, 1992	Trabajadores	38E	Cd en orina	Ocupacional	90% cefalea, 42% mareo, 21% debilidad, 16 atrofia cerebral
Rose CS, 1992	Trabajadores	55E/16C	Cd en orina	Ocupacional	Hiposmia
Okuda B, 1997	Caso clínico	1	Fallo multiorgánico	Ocupacional agudo	Parkinsonismo
Viaene MK, 1999	Trabajadores	13E/19C	Cd en orina	Ocupacional	Polineuropatía
Viaene MK, 2000	Trabajadores	42E/47C	Cd en orina	Ocupacional	Disminución velocidad motora, de atención, memoria, PNP, alteración concentración
Sethi PK, 2006	Caso clínico	1	Cd en orina	Ocupacional	Neuropatía periférica
Bao QS, 2009	Niños	469	Cd en pelo	Vida diaria	Problemas sociales y de atención

Tabla 2. Revisión bibliográfica de neurotoxicidad del cadmio en humanos (Modificado de Wang et al. 2013)

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Productos químicos

Los compuestos cloruro de cadmio (99,99%), acetilcolina, tetraisopropilo pirofosforamida (iso-OMPA), acetiltiocolina, ácido ditio-nitrobenzoico, poli-L-lisina, dimetil sulfóxido (DMSO), dibutiril-AMPC, ácido retinoico, N-acetilcisteína (NAC), ácido ditionitrobenzoico, tetracloruro de 3,3'-diaminobencidina, anticuerpo monoclonal anti proteína-2 asociada a microtúbulos (MAP-2), paraformaldehído y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) se obtuvieron de Sigma (Madrid, España). [^{14}C] acetil-CoA y [^3H] pirenzepina se obtuvieron de Perkin Elmer (Madrid, España). Los filtros GF/B Whatman de fibra de vidrio fueron obtenidos de Millipore (Madrid, España). Todos los demás productos químicos fueron de grado reactivo de la pureza más alta disponible de laboratorio.

4.2. Cultivo primario de neuronas del prosencéfalo basal

En el prosencéfalo basal se localizan las neuronas colinérgicas de la sustancia innominada, de la banda diagonal de Broca y del núcleo basal de Meynert. Estas neuronas proyectan principalmente al neocórtex, a la corteza cingulada y a la amígdala. Los núcleos colinérgicos están implicados en la modulación de los procesos cognitivos, atención, aprendizaje y memoria.

Los cultivos primarios de células disociadas son un modelo simplificado que permite una evaluación fácil, en un tipo celular específico, de características como la morfología celular, el metabolismo energético, las interacciones con receptores, neurotransmisión y la

vulnerabilidad de diferentes tipos de células a estímulos tóxicos (Silva et al., 2006). Utilizamos cultivos primarios de neuronas del prosencéfalo basal para evaluar la toxicidad selectividad del cadmio sobre las neuronas colinérgicas del SNC y para evaluar si el silenciamiento de RM1 induce una muerte más pronunciada sobre las neuronas colinérgicas de prosencéfalo basal.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices de la Unión Europea (2003/65/CE) y la normativa española (BOE 67/8509-12, 1988) sobre el uso de animales de laboratorio. Ratas Wistar gestantes (Charles River, Barcelona, España) fueron anestesiadas, entre los días 17-18 de gestación, con pentobarbital sódico, se extrajeron los embriones y se diseccionaron sus cerebros bajo un microscopio estereoscópico (Olympus SZ51, Barcelona, España) (Schnitzler et al., 2008). Se recogió el prosencéfalo basal en Hibernate E (Life Technologies, Madrid, España) y se disoció por incubación durante 10 minutos a 37°C en 1 ml de solución de tripsina-EDTA (0,25%, Invitrogen, Madrid, España) y 0,5 ml DNasa (Sigma, D4263, Madrid, España). Tras la tripsinización, se aspiró la solución de tripsina/DNasa y se añadieron 0,5 ml de albúmina sérica bovina al 4% (BSA, Sigma, Madrid, España), 1 ml de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM/F-12 con Glutamax-1, Life Technologies, Madrid, España), complementado con un 20% de suero bovino fetal (FBS, Sigma, Madrid, España), antibióticos (penicilina/estreptomicina 1 ml/L, Sigma, Madrid, España) y 2 ml de solución de DNasa. Las células se disociaron posteriormente mediante trituración suave usando una pipeta Pasteur pulida con fuego. La suspensión se centrifugó a 250 x g (Eppendorf 5804R, Madrid, España) durante 5 minutos y el sedimento se resuspendió en medio de crecimiento (véase más arriba) y se obligó a pasar a través de un filtro de malla de nylon de 40 mm. Esta suspensión se recentrifugó (250 x g, 5 min) y se resuspendió en medio de crecimiento (véase más arriba). La suspensión de células se sembró a una densidad de 10^6 células/ml en cubres de vidrio (22 mm de diámetro) revestidos de poli-L-lisina (0,10 mg/ml) colocados en placas de

Petri de plástico (35 mm de diámetro) recubiertas con poli-L-lisina. Tras la incubación durante 12 horas a 37°C en una atmósfera humidificada al 95% de aire/CO₂ al 5%, se cambió el medio con un medio nutritivo libre de suero compuesto por DMEM, insulina (400 µl, Sigma, Madrid, España), transferrina (50 µl, Sigma, Madrid, España), progesterona (100 µl, Sigma, Madrid, España), putrescina (16 mg/L, Sigma, Madrid, España), selenita sódica (100 µl, Merck, Madrid, España) y penicilina/estreptomicina (Gensburger et al., 1986).

La viabilidad celular se evaluó mediante el método de exclusión del colorante azul tripan al 0,4% (Sigma, Madrid, España), la cual fue rutinariamente superior al 95%. Las células primarias del cultivo fueron inmunohistoquímicamente caracterizadas con MAP2 (marcador neuronal) y GFAP (marcador astrocítico) para comprobar la pureza del cultivo celular y se observó un predominio de neuronas (92%).

Este cultivo primario neuronal, tras unos días de cultivo (6-7 días *in vitro*), forma una red de contactos sinápticos funcionales, adquiriendo las características de neuronas maduras. Al séptimo día, se adicionó cloruro de cadmio en concentraciones entre 10⁻² M y 10⁻⁷ M. El rango de dosis utilizadas cubre las concentraciones descritas que disminuyen la viabilidad celular (Templeton y Liu, 2010) y alteran la actividad de la AChE (Zarros et al., 2013). Tras 24 horas de incubación con cloruro de cadmio, se realizaron al menos 3 repeticiones/tratamiento. Se empleó un grupo vehículo que contenía 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) en paralelo para cada experimento como control.

4.3. Línea celular SN56

La degeneración de las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal en pacientes con EA está bien documentada y probablemente contribuye a la pérdida de memoria característica de esta enfermedad, a la hora de desarrollar estudios experimentales de investigación es útil disponer de cultivos celulares que expresan fenotipo colinérgico. La línea celular colinérgica del cerebro basal anterior murino SN56.B5.G4 deriva de la fusión de neuronas septales del día 21 postnatal de ratón y la línea de neuroblastoma murino N18TG2, estas células exhiben un fenotipo neuronal colinérgico (Hammond et al., 1986). Esta línea celular ofrece un sistema homogéneo que permite un análisis fácil de una gran variedad de tratamientos o efectos tóxicos en un ambiente bien controlado.

Se utilizaron células SN56, una línea celular colinérgica de neuroblastoma murino derivada de neuronas septales (Hammond et al., 1990), como modelo de neuronas colinérgicas de la región cerebral basal anterior para evaluar los efectos tóxicos del cadmio en este tipo específico de neuronas y los mecanismos a través de los que son inducidos. Las células se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ en DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), penicilina/estreptomicina, L-glutamina 2 mM (Sigma, Madrid, España), y piruvato de sodio 1 mM. El medio se cambió cada 48 horas (Hudgens et al., 2009). La diferenciación de las células SN56 se realizó mediante el cultivo durante 3 días con dibutilil-AMPc 1 mM y ácido retinoico 1µM (Bielarczyk et al., 2003; Szutowicz et al., 2006), que produce la maduración morfológica y un aumento de 3-4 veces la actividad de ChAT y el nivel de acetilcolina en estas células. Se ha descrito que las células así diferenciadas son más sensibles a compuestos neurotóxicos que afectan a las vías colinérgicas (Bielarczyk et al., 2003; Szutowicz et al., 2006).

Con el fin de determinar el efecto del cadmio sobre el contenido celular de acetilcolina

(ACh), del malondialdehído (MDA), del cometido de lactato deshidrogenasa (LDH) y el contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), las actividades de la AChE y la acetilcolina transferasa (ChAT), el bloqueo del receptor muscarínico M1, la expresión génica de la AChE y sus variantes, del transportador de colina de alta afinidad (CHT), del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), del receptor muscarínico M1, GSK-3 β y β APP, así como los efectos del silenciamiento de AChE, RM1, GSK-3 β y β APP o el co-tratamiento con antioxidantes sobre la viabilidad celular y de la interacción de estos mecanismos entre sí, las células SN56 fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 10^6 células/pocillo. Las células fueron tratadas durante 24 h con cadmio a concentraciones entre 0,1 μ M a 10mM con o sin N-acetil cisteína (NAC; 1 mM) y con o sin Ach (0,01 μ M-100 μ M). Se usaron al menos 3 réplicas pocillos/tratamiento. Un grupo tratado con el vehículo del cadmio se empleó en paralelo para cada experimento como grupo control.

4.4. Protocolo y diseño experimental

Existe poca información sobre la concentración de cadmio que puede llegar al SNC tanto tras exposición aguda como crónica. La mayor exposición crónica ocurre en los trabajadores de minas e industrias como fundiciones, fábricas de baterías, soldaduras, plantas de incineración de residuos y producción de pigmentos o en los residentes de áreas contaminadas con cadmio por su proximidad a estas industrias. En este sentido, se ha descrito que los mineros expuestos crónicamente al cadmio alcanzan niveles de hasta 6,2 μ M en el SNC (Falnoga et al., 2000). También, se ha descrito, en los residentes que vivían próximos a una fundición, que los niveles de cadmio presentes en el SNC eran en torno a 1,4 μ M (Auermann et al. 1979). Por otra parte, los niveles de cadmio en el SNC determinados en las autopsias de pacientes con enfermedad de Alzheimer alcanzaron hasta 1,2 μ M (Panayi et al., 2002). Los valores observados de cadmio en

diferentes regiones cerebrales en las autopsias de los individuos control fueron desde 0,2 μM a 0,9 μM (Falnoga et al., 2000; Panayi et al., 2002). Se ha descrito que los fumadores presentan en su cuerpo dos veces los niveles de cadmio presentes en los no fumadores, y estos valores son cuatro veces más altos en los grandes fumadores (ATSDR, 2012), lo que implica que los niveles en su cerebro podrían ser superiores a 1 μM teniendo en cuenta los valores normales encontrados en los no fumadores. Además, se ha descrito que la BHE no está completamente desarrollado en los animales jóvenes (Wang y Du, 2013), por lo que pueden llegar al cerebro concentraciones de cadmio más altas que las que se alcanzan en adultos, aunque no hay datos disponibles. De acuerdo con estos datos, las concentraciones de cadmio desde 1 μM a 10 μM serían relevantes para la exposición humana crónica. La exposición aguda puede ocurrir a grandes dosis como riesgo ocupacional o por una fuga accidental de cadmio. En estos casos no hay información de los niveles de cadmio que podrían llegar al SNC, aunque probablemente estaría alrededor de 100 μM , como han descrito Hossain et al. (2009). Por lo tanto, las concentraciones de cadmio desde 10 μM a 100 μM serían relevantes para altos niveles agudos de exposición. En este sentido, hemos elegido las concentraciones desde 1 μM a 100 μM para determinar los efectos del cadmio sobre la viabilidad celular, toxicidad selectiva sobre las neuronas colinérgicas del PSB, el bloqueo del RM1, el contenido de las proteínas A β 1-40 celular, A β 1-42, Tau totales y fosforiladas, y la expresión de la enzima GSK-3 β y las variantes de la AChE. Hemos elegido la concentración de 10 μM por ser relevante para tanto la toxicidad aguda como crónica, para probar la hipótesis de que el cadmio media sus mecanismos descritos por bloqueo del RM1 a través de las variantes de la AChE. La Figura 1 representa el diseño experimental seguido en la investigación.

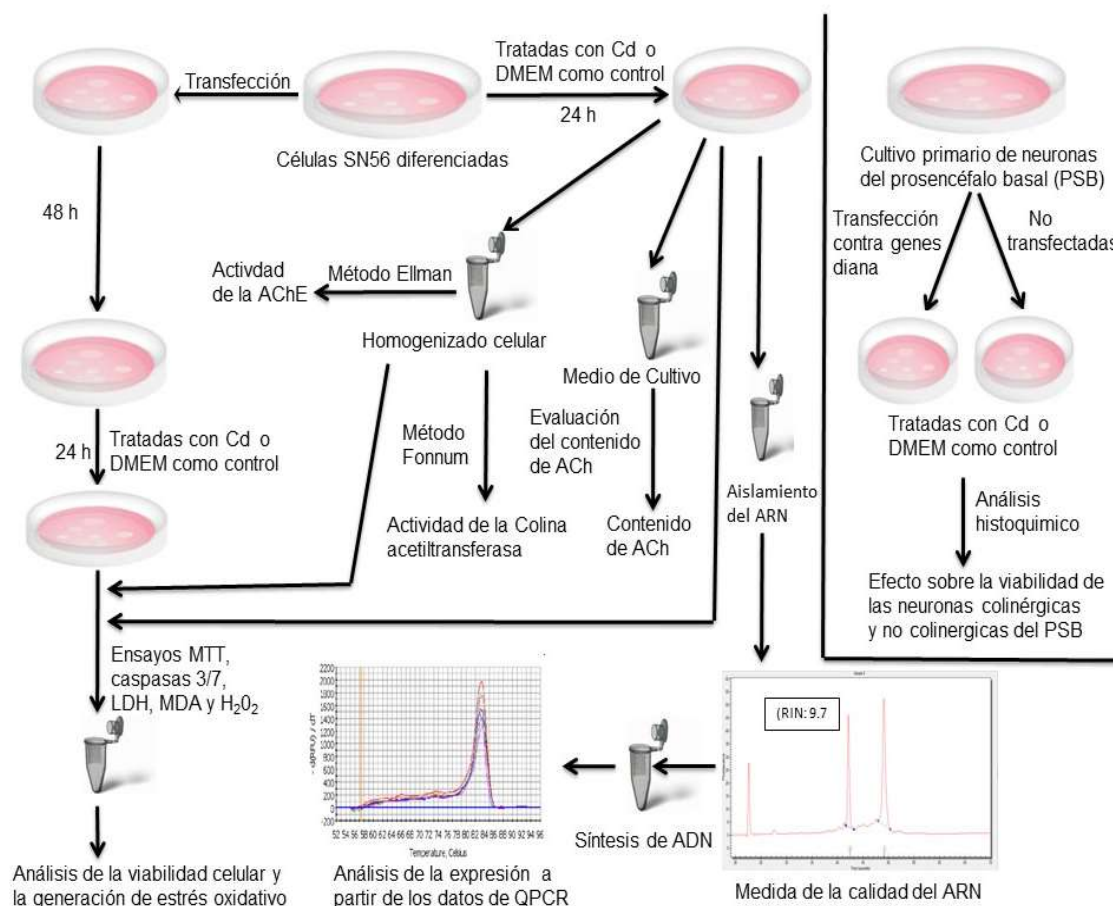


Figura 1. Representación esquemática del diseño experimental de la investigación.

4.4.1 Análisis histoquímicos de la toxicidad selectividad sobre las neuronas colinérgicas.

Como marcador de las neuronas colinérgicas, elegimos la AChE, debido a que todas las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal expresan AChE, lo que la convierte en un marcador válido para las neuronas colinérgicas de esta región (Makuch et al., 2001). Además, se expresa durante el crecimiento de los axones colinérgicos, mientras que la ChAT, también marcador de las neuronas colinérgicas, puede no ser expresado durante el crecimiento de los mismos (Makuch et al., 2001).

Tras 24 horas de incubación, los cultivos primarios se fijaron y tiñeron para detectar la AChE, según el procedimiento descrito por Karnovsky y Roots (1964), que tiñe selectivamente

los gránulos que contienen AChE en un color oscuro (Figura 1 (A)). Se observaron las neuronas AChE+ (40 x) con un microscopio óptico (Olympus BX50, Madrid, España) y se analizaron de forma aleatoria al menos seis lugares diferentes por cuadrante en el mismo porta (cámara digital, Olympus DP50, Madrid, España). Las células de cada ubicación se contaron en imágenes digitales utilizando el software Adobe Photoshop Elements. Se determinó el total de las células AChE+ y AChE-. Los recuentos de células se hicieron dos veces y a continuación se hizo el promedio de los mismos.

4.4.2 Análisis de la viabilidad celular de neuronas SN56

La determinación de los efectos del Cd sobre la viabilidad celular fue realizada a través del método del MTT y de la determinación de la liberación del LDH resultado de la muerte neuronal por necrosis. El método del MTT se basa en la ruptura de la sal de MTT tetrazolio de color amarillo dando lugar a cristales de formazán de color púrpura por la acción de la deshidrogenasa mitocondrial. Las células se incubaron con 100 μ l de solución de MTT (concentración final 0,5 mg/ml) durante 4 h después del tratamiento con Cd. Después de 4 h a 37°C, el medio se eliminó y la sal de formazán se disolvió en 250 μ l de DMSO. La formación de producto de formazán solubilizado se midió espectrofotométricamente a 570 nm (Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluorometer and Luminometer, ThermoFisher Scientific, Madrid, España). Se tomó como 100% de viabilidad las células control tratadas con DMSO.

La determinación de la liberación de LDH al medio de cultivo se realizó usando el kit Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, el medio de cultivo se retiró y se pipeteó en placas de 96 pocillos. Se añadió la mezcla maestra de reactivos, y después de 3 min se determinó la

intensidad colorimétrica a 450 nm cada 5 minutos utilizando un espectrofotómetro de microplacas.

Finalmente, la inducción de la apoptosis se determinó a través de la medida de la activación de las caspasas 3/7 por medio del uso de kit Caspase-Glo 3/7 Luminescence Assay Kit (Promega, Madrid, Spain), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, al final del tratamiento, las células SN56 cultivadas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), las células se rasparon y recogieron en un tubo de microcentrífuga en oscuridad. A las células se les adicionaron volúmenes iguales de reactivo y de tampón lisis y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 1 hora y la luminiscencia resultante se leyó en cada muestra. Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.4.3 Silenciamiento de genes

El silenciamiento del gen RM1 en cultivos primarios de neuronas y los genes RM1, GSK-3 β , β APP, ChAT y AChE en las células SN56 se realizó transfectando las mismas con ARNsi en placas de 6 pocillos (1×10^6 células/pocillo) usando el reactivo de transfección HiPerfect de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Barcelona, España). Dos conjuntos de ARNsi dúplex (Qiagen, Barcelona, España) homólogas a las secuencias de los genes RM1 de rata y RM1, GSK-3 β , β APP, ChAT y AChE de ratón fueron diseñadas utilizando el Algoritmo de diseño HiPerformance (Norvatis AG) y fueron adquiridos de Qiagen (números de catálogo SI00280084, GS12669, GS56637, GS11820, y GS11423, respectivamente). Como control de transfección, se utilizó el control negativo ARNsi All Star (Qiagen, Barcelona, España). 48 h después de la transfección, la eficacia del silenciamiento de RM1, GSK-3 β , β APP y AChE se determinó por RT-PCR utilizando cebadores específicos de ratón para la secuencia

de ARNm de RM1, GSK-3 β , β APP y AChE (Qiagen, Barcelona, España). Los efectos del silenciamiento de RM1 sobre la sensibilidad de las neuronas colinérgicas del PSB a la muerte neuronal se estudiaron mediante el análisis histoquímico de tinción de las neuronas AChE⁺. Los efectos del silenciamiento de RM1, GSK-3 β , β APP y AChE en la lesión de las células SN56 se analizaron mediante el ensayo de MTT, el ensayo del LDH y el ensayo de activación de las caspasas 3/7. Los efectos del silenciamiento de RM1 y AChE sobre la inducción de los mecanismos de inducción de la producción de proteínas beta amiloides, Tau, sobreexpresión de GSK-3 β y la actividad de la ChAT se estudiaron por medios de los test de determinación de proteínas A β y Tau, por análisis de PCR en tiempo real y por el método de Fonnum de la medida de la actividad de la ChAT, respectivamente. Además, el efecto del silenciamiento de α ₇-nAChR en la generación de estrés oxidativo se determinó por el ensayo de la peroxidación lipídica y la medición de los niveles de peróxido de hidrógeno. Por último, los efectos del silenciamiento de α ₇-nAChR sobre la expresión génica de AChE-S y AChE-R se determinaron por análisis de PCR en tiempo real. Tras 24 horas de incubación con los ARNsi, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante otras 24 horas en medio de cultivo con o sin cadmio.

4.4.4. Análisis de las actividades enzimáticas en neuronas SN56

Se determinó la actividad de la AChE tras 24 horas de exposición a cadmio, usando el método estándar Ellman de tiocolina (Ellman et al., 1961), con modificaciones menores (Hartl et al., 2011; Zimmermann et al., 2008), y los valores de actividad se normalizaron frente a la concentración total de proteína determinada a través del uso kit BCA (ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain). Brevemente, al final de los tratamientos, las células SN56 se lavaron con tampón fosfato, se recogieron por raspado, y se lisaron usando un tampón RIPA (Thermo Scientific, Madrid, España) con un cóctel de inhibidores de proteasas (ThermoFisher Scientific,

Madrid, España). Después de la centrifugación a 10.000 x g durante 10 min a 4°C, el sobrenadante del lisado celular (10 µl) se pipeteó en una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía tampón Ellman, así como iso-OMPA, (concentración final 100 mM). El ensayo cinético se inició por adición de acetiltiocolina y ácido ditionitrobenzoico (1 mM y 500 mM concentraciones finales, respectivamente). La absorbancia se leyó usando un lector de placas (412 nm). Todas las muestras se realizaron por triplicado. La actividad de la AChE se calculó como nmol/min/mg de proteína y se representa como porcentaje respecto al control. La actividad de butirilcolinesterasa fue inhibida por iso-OMPA.

La enzima ChAT cataliza la transferencia de un grupo acetilo de la coenzima A, acetil-CoA, con la colina dando lugar a la ACh. La actividad de la ChAT se midió en el homogenizado celular por medio del método radio-enzimático de Fonnum (Fonnum, 1975), con una modificación que implica la incorporación de [C^{14}] acetil-CoA en la ACh (Mennicken y Quirion, 1997; Zheng et al., 2002). Los cultivos control y tratados (de placas de 6 pocillos por muestra) se lavaron con PBS, se rasparon en 100 µl de tampón de homogenización frío (tampón fosfato de sodio 40 mM, pH 7,4, que contiene 200 mM de NaCl y 0,5% Triton X-100) y luego se homogenizaron mediante sonicación (Zheng et al., 2002). La radioactividad correspondiente al producto de reacción ([C^{14}] ACh) se midió por medio de un medidor de cuentas. Todos los valores de actividad de ChAT, obtenidos por triplicado para cada muestra, se expresaron como pmol de ACh sintetizada/h/mg de proteína.

4.4.5. Análisis de la concentración de ACh en neuronas SN56

Para determinar la concentración de ACh en el medio de cultivo se usó un kit comercial colorimétrico/fluorométrico (Abcam, Cambridge, Reino Unido) (Reale et al., 2012) de acuerdo

con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recogió el medio de cultivo después de 24 horas de tratamiento y se centrifugó a 800 x g. Posteriormente, el sobrenadante se liofilizó, y se reconstituyó en 50 µl del tampón de ensayo, y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis. 50 µl de la muestra se mezclaron con 50 µl de solución de reacción que incluye tampón de ensayo para la colina, la sonda de colina y AChE de acuerdo con las instrucciones. Cada muestra se ensayó por triplicado, y todo el experimento se llevó a cabo por triplicado. El nivel de ACh (pmol/pocillo) se calculó mediante la gráfica de la fluorescencia de cada muestra frente a las concentraciones estándar de colina. La medición de la fluorescencia se determinó a λ Ex/Em 535/587 nm.

4.4.6. Análisis de la expresión génica

Para la realización de la determinación de los cambios en la expresión genética tras la exposición aguda al cadmio se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa semicuantitativa (QPCR). El ARN total fue extraído mediante el método del Trizol (Invitrogen, Madrid, España). La concentración final de ARN se determinó usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) y la calidad de las muestras del ARN total se evaluó utilizando el LabChip Experion (Bio-Rad, Madrid, España). La síntesis del ADN complementario del ARN se realizó con 1.000 ng de ARN usando el kit de síntesis PCR Array First Strand-Synthesis Kit (C02; SuperArray Bioscience, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante, incluyendo un paso de eliminación de ADN genómico y controles de ARN externos. Después se realizó la QPCR utilizando conjuntos de cebadores prevalidados de los genes en estudio incluyendo una etapa de eliminación de ADN genómico y controles de ARN externos. Después de la transcripción inversa, se realizó una QPCR utilizando conjuntos de cebadores prevalidados (SuperArray Bioscience) que codifican

para el ARNm de ChAT (PPM57674A), VAcHT (PPM04178), CHT (PPM31807A), AChE (PPM35356A), RM1 (PPM03990A), GSK-3 β (PPM03380C), β APP (PPM37085A) y ACTB (PPM02945B). Los cebadores para ambas isoformas de la AChE, R y S, (Tabla 1) se tomaron de Shaltiel et al. (2013). Las reacciones se realizaron en un CFX96 mediante Real-Time PCR SYBR Green Master Mix PA-012 (SuperArray Bioscience). Los parámetros del termociclador fueron 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos. Se utilizó el gen de la beta actina (ACTB) como un control interno para la normalización. Los cambios relativos en la expresión génica se calcularon utilizando el método de Ct (ciclo umbral). Los datos de expresión se presentan como múltiplos de cambio reales (Livak y Schmittgen, 2001).

Tabla 3. Cebadores usados para la determinación de la expresión génica de las variantes de la AChE.

Abreviatura	Gen	Referencia	Cebadores Sentido (S) y Antisentido (R)
AChE-S	Acetilcolinesterasa	Shaltiel et al., (2013)	S-ctgaacctgaagcccttagag A-ccgcctcgtccagagtat
AChE-R	Acetilcolinesterasa	Shaltiel et al., (2013)	S-gagcaggggaatgcacaag A-ggggaggtaaagaagagag

Elegimos el estudio de los genes ChAT, VAcHT, y AChE para determinar el efecto del Cd sobre la transmisión colinérgica, debido a que el neurotransmisor ACh es sintetizado por la enzima ChAT (Oda, 1999) y la enzima CHT media la recaptación de la colina a nivel presináptico como paso limitante de la velocidad de síntesis de la ACh (Bazalakova y Blakely, 2006). VAcHT es responsable del transporte de la acetilcolina desde el citoplasma a las vesículas sinápticas, siendo este un paso limitante en la liberación de ACh (Oda, 1999). Por último, la AChE descompone la acetilcolina, terminando, por lo tanto, el proceso de neurotransmisión (Ballard et al., 2005).

4.4.7. Análisis de la inducción de estrés oxidativo en neuronas SN56

Para determinar la inducción de estrés oxidativo tras la exposición aguda a cadmio medimos la concentración de MDA (indicador de la peroxidación de lípidos) y de H_2O_2 (indicador de la inducción de radicales libres). La concentración intracelular de MDA se cuantificó después de 24 horas de exposición a cadmio con o sin NAC (1 mM) usando el kit MDA Assay Kit (Abcam, Cambridge, Reino Unido), siguiendo el protocolo del fabricante. Tras el tratamiento se recogieron 1×10^6 células y se homogenizaron en tampón de lisis de MDA (300 μ l) en hielo, con 3 μ l de butil hidroxitolueno (BHT) (100X) y se centrifugaron durante 10 min a 13.000 x g para eliminar el material insoluble. La muestra (200 μ l) o estándar (200 μ l de MDA) se mezcló con 600 μ l de solución de terbutanol (TBA), se incubaron a 95°C durante 50 min y se enfriaron a temperatura ambiente en un baño de hielo durante 10 min. Se añadió cada muestra y estándar (200 μ l) (duplicado) a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 532 nm usando un lector de microplacas. La concentración de malondialdehído fue determinada como nmol/mg de proteína y se representa como porcentaje respecto al control.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una de las especies de oxígeno reactivas (ERO) producidas bajo condiciones de estrés oxidativo. El contenido de H_2O_2 se midió usando el kit Hydrogen Peroxide Assay Kit (Abcam, Cambridge, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, después de 24 horas de tratamiento con la cadmio con o sin NAC (1 mM), las células sin transfectar y las células SN56 transfectadas se recogieron en tampón de ensayo H_2O_2 y luego se centrifugó durante 15 min a 1.000 x g. Un total de 50 μ l del sobrenadante se mezcló con 50 μ l de la mezcla de reacción (tampón de ensayo: 46 μ l; sonda OxiRed: 2 μ l; HRP: 2 μ l) y después se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. La densidad óptica se leyó a 570 nm con un lector de microplacas, y la concentración de H_2O_2 se

calculó de acuerdo con una curva de concentración estándar. El contenido de peróxido de hidrógeno en las muestras se expresa en nanomoles por mililitro y se representa como porcentaje respecto al control.

4.4.8. Análisis de bloqueo de los receptores muscarínicos M1 en neuronas SN56

Para llevar a cabo el análisis del bloqueo de los RM1 por el cadmio, se procedió sobre el cultivo de neuronas colinérgicas SN56 a retirar el medio de cultivo y las células se lavaron con solución salina tamponada con tampón fosfato en frío. A continuación, las células se rasparon en un tampón Tris-HCl 20 mM enfriado en hielo, que contenía MnCl₂ 1,0 mM a pH 7,4 y a continuación se lisaron. El lisado celular se centrifugó a 32.500 x g durante 30 minutos a 4°C y el sedimento se resuspendió en el mismo tampón a una concentración de proteína de 3 mg/ml. Estas preparaciones se usaron inmediatamente o se almacenaron a -80°C. La afinidad del cadmio por los receptores muscarínicos M1 se evaluó determinando el desplazamiento de la unión de [³H] pirenzepina (Perkin Elmer, Madrid, España) a los RM1 de las membranas de las células SN56. Los ensayos se llevaron a cabo con [³H] pirenzepina 10 nM, 5 mg de lisado de células y una de las concentraciones de cadmio a evaluar (incluida cero) en cada tubo. Se ensayó cada concentración de cadmio por triplicado. La reacción se inició con la adición del lisado con las membranas celulares, y los tubos se incubaron a 22°C durante 60 min. La incubación se terminó mediante la adición de 5 ml de tampón enfriado en hielo y la filtración rápida a través de un papel de filtro de fibra de vidrio Whatman GF/B (previamente endurecido en polietilénimina al 0,5%). Los filtros se lavaron dos veces con 5 ml de tampón enfriado en hielo y se transfirieron a viales de conteo de cuentas a los que se añadieron 3 ml de cóctel de conteo de cuentas Beckman Ready Safe. Los valores de unión obtenidos (pmol) se

normalizaron por los valores de concentración de proteína dando una unidad final de pmol/mg y se presentaron como porcentaje de control sin tratar.

4.4.9. Análisis del contenido de proteínas beta-amiloides y Tau en neuronas SN56

Se recogieron los medios procedentes de los cultivos de neuronas SN56 tanto control como tratados (de placas de 6 pocillos por muestra) y se centrifugaron a 3000 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con tampón fosfato, las células se rasparon en 100 µl de tampón de lisis en frío (Tris 50 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, inhibidores de proteasas y fosfatasas) y se incubaron en hielo durante 5 minutos. A continuación, los lisados se centrifugaron a 14.000 x g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante resultante se almacenó para el análisis. Se analizaron los medios de cultivo para determinar los niveles totales de proteínas Tau (KMB7011) y Tau fosforilados (KMB7041), y se analizaron los lisados celulares para determinar los niveles de proteínas Aβ 1-40 (KMB3481) y Aβ 1-42 (KMB3441) utilizando kits ELISA disponibles comercialmente (Invitrogen, Madrid, España), siguiendo los protocolos del fabricante. Para tener en cuenta en dichos análisis la concentración de proteínas, se midió la concentración de proteína total presente en los lisados celulares mediante el kit BCA (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los valores obtenidos en los tests de ELISA (pg/ml) fueron normalizados con la concentración intracelular total de proteínas (µg/ml), dando lugar a una unidad final de pg/µg y presentada como porcentaje de control no tratado

4.4.10. Análisis estadístico

Los datos se representan como media \pm desviación estándar (DE).

Las comparaciones entre los grupos experimentales y control se realizaron mediante análisis de la test de Student para determinar las diferencias significativas entre un tratamiento y su control, el análisis ANOVA de tres vías para la determinación de la interacción entre el tipo de neurona, silenciamiento de genes y el tratamiento, el análisis ANOVA de dos vías para determinar la interacción entre el tratamiento y la transfección, y el análisis ANOVA de una vía para la determinación de diferencias significativas entre diferentes dosis de un tratamiento o entre los diferentes cuadrantes, seguido por la prueba post-hoc de Tukey.

La diferencia estadística fue aceptada cuando $p \leq 0,05$.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo por ordenador utilizando el software GraphPad Prism 5.0 para Windows.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Efecto del cadmio sobre la viabilidad de las neuronas colinérgicas del PSB

Se analizó un promedio de 6 campos microscópicos seleccionados al azar para cada cuadrante. En este estudio, el porcentaje promedio de células AChE + del total de las células neuronales fue de $18 \pm 1,6\%$. Este porcentaje no varió entre los diferentes cuadrantes ($p = 0,712$, ANOVA de una vía). Se encontró una reducción significativa dosis-dependiente en el número de neuronas del prosencéfalo basal en los grupos tratados con cadmio en comparación con el grupo de control (Figura 2 B), siendo más pronunciada la reducción en el número de neuronas AChE + (Figuras 2A y 2B).

5.2. Efecto del silenciamiento de RM1 en las neuronas del PSB

Se analizó un promedio de 6 campos microscópicos seleccionados al azar para cada cuadrante (Figura 3A). El promedio del porcentaje de AChE + en los cultivos control entre todas las células neuronales fue de $17,6 \pm 1,8\%$. Este porcentaje no varió entre los diferentes cuadrantes ($p = 0,612$, ANOVA de una vía) (datos no presentados). En comparación con los controles, se encontró una reducción significativa en el número de neuronas del prosencéfalo basal en los cultivos no transfectados tratados con cadmio, así como en las neuronas silenciadas para RM1 tratadas con o sin cadmio.

La pérdida de neuronas AChE+ fue mayor que la observada en cualquier otro tipo de neurona ($p < 0,001$, ANOVA de tres vías) tanto en las neuronas no transfectadas tratadas con

cadmio como en las neuronas silenciadas para RM1 tratadas con o sin cadmio (Figura 3B). Además, la disminución de la viabilidad celular fue mayor en las células silenciadas para RM1 tratadas con cadmio que en las células no transfectadas tratadas con cadmio o las células solo silenciadas para RM1 ($p < 0,001$, ANOVA de tres vías) (Figura 3B). La transfección de células con el control de ARN de silenciamiento no mostró ningún efecto sobre la expresión de RM1 y la viabilidad celular, pero el silenciamiento de RM1 causó una gran reducción en la expresión del gen RM1 (Figuras 3B y 3C).

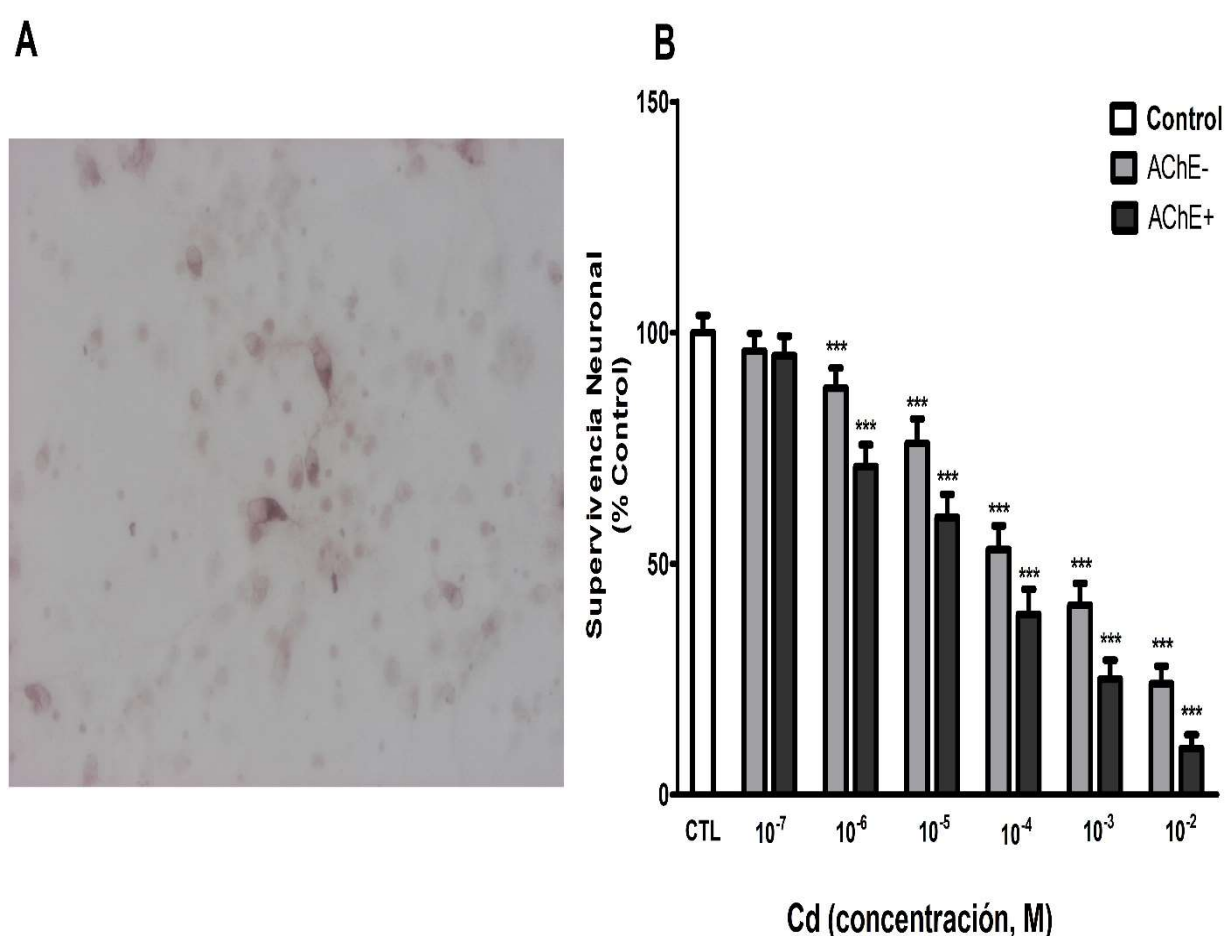


Figura 2. Tras 7 días de cultivo, las neuronas se trataron con vehículo o Cd durante 24 h y se tiñeron para AChE. (A) La imagen muestra las neuronas AChE positivas y negativas (40X) del prosencéfalo basal de rata tras el tratamiento con cadmio (10^{-4} M). (B) El gráfico muestra el porcentaje de reducción de las neuronas de AChE \pm tras el tratamiento con cadmio. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control.

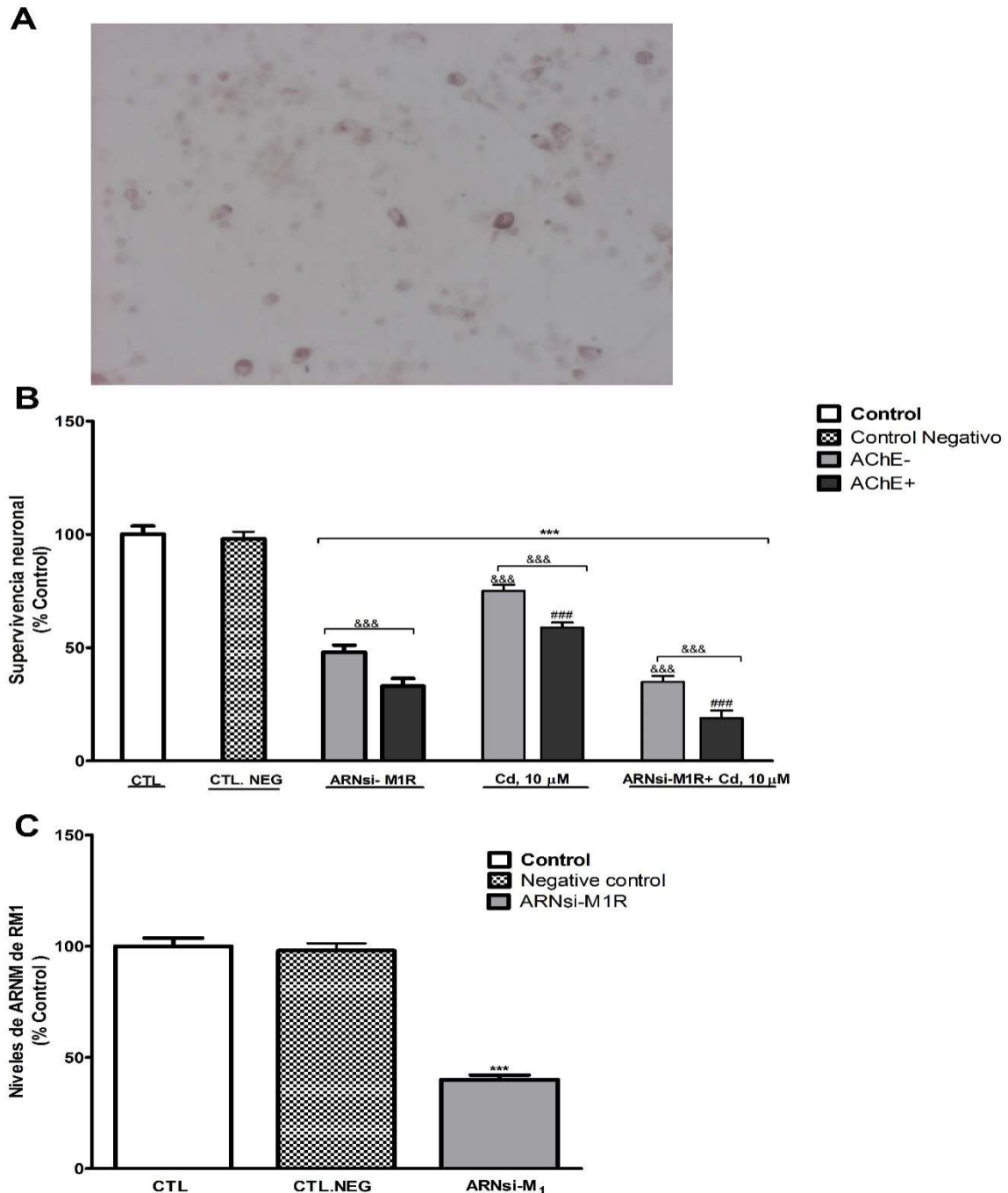


Figura 3. Tras 7 días de cultivo, las neuronas fueron transfectadas con ARNsi-RM1 y 48 horas más tarde se tiñeron para AChE. Control: neuronas del prosencéfalo basal transfectadas sin ARNsi. Control Negativo (Neg.): neuronas del prosencéfalo basal transfectadas con ARNsi inespecífico. ARNsi-RM1: transfectadas con ARNsi contra RM1. (A) La fotomicrografía muestra neuronas cultivadas del prosencéfalo basal de la rata AChE positivas y negativas (40X) tras el tratamiento con cadmio. (B) El gráfico muestra el porcentaje de reducción de neuronas AChE + /-tras el silenciamiento del RM1. (C) El silenciamiento del RM1 puede detectarse por RT-PCR análisis tras 48 h de la transfección. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control; &&& $p < 0.001$ comparado con las neuronas AChE- silenciadas para RM1; ### $p < 0.001$ comparado con las neuronas AChE + silenciadas para RM1.

5.3. Efecto del cadmio sobre la viabilidad de células SN56 a través de los ensayos del MTT y el LDH.

Se utilizaron las pruebas de MTT y LDH para evaluar la supervivencia celular tras 24 horas de exposición al cloruro de cadmio a concentraciones crecientes (10^{-7} M – 10^{-2} M). El ensayo MTT indica cambios en la actividad metabólica asociados a la supervivencia celular (viabilidad celular). La prueba de MTT, tras el tratamiento con cloruro de cadmio, mostró una disminución en el metabolismo mitocondrial y una clara reducción dependiente de la concentración en la viabilidad celular comparada con las células tratadas con vehículo (control negativo) (Figura 4A). Tras la co-incubación de cadmio con ACh (10^{-8} M – 10^{-4} M), no se observó un efecto significativo sobre la viabilidad con respecto de las células de control (datos no mostrados), pero tras el tratamiento con cadmio de células silenciadas para AChE se observó una menor disminución en la reducción de la viabilidad celular (Figura 4A). Además, tras el tratamiento con cadmio (1-100 μ M) de las células SN56 silenciadas de forma independiente o simultáneamente para AChE, β APP y GSK-3 β , se observó una mejora en la reducción de la viabilidad celular (Figura 5A). Sin embargo, tras el silenciamiento del RM1, se observó una reducción en la viabilidad celular (Figura 5A), que fue menor que la observada tras el tratamiento con cadmio de células silenciadas para RM1, o tras el tratamiento solamente con cadmio a la concentración más alta. El silenciamiento simultáneo del RM1, AChE, β APP y GSK-3 β revertió parcialmente la muerte celular observada tras el silenciamiento sólo del RM1 (Figura 5A). El tratamiento con cadmio de las células silenciadas simultáneamente para RM1, AChE, β APP y GSK-3 β , redujo la viabilidad celular de una manera concentración-dependiente, aunque esta reducción fue menor que la observada tras el tratamiento sólo con cadmio o tras el silenciamiento sólo de RM1 (Figura 4A). La transfección de células con ARN de silenciamiento control no produjo ningún efecto sobre la viabilidad celular (Figura 6A). Por último, el

tratamiento solo con NAC (1 mM) no alteró la viabilidad celular (Figura 7A). El co-tratamiento con Cd y NAC de células SN56 durante 24 h produjo una atenuación parcial de la reducción de la viabilidad celular (Figura 6A).

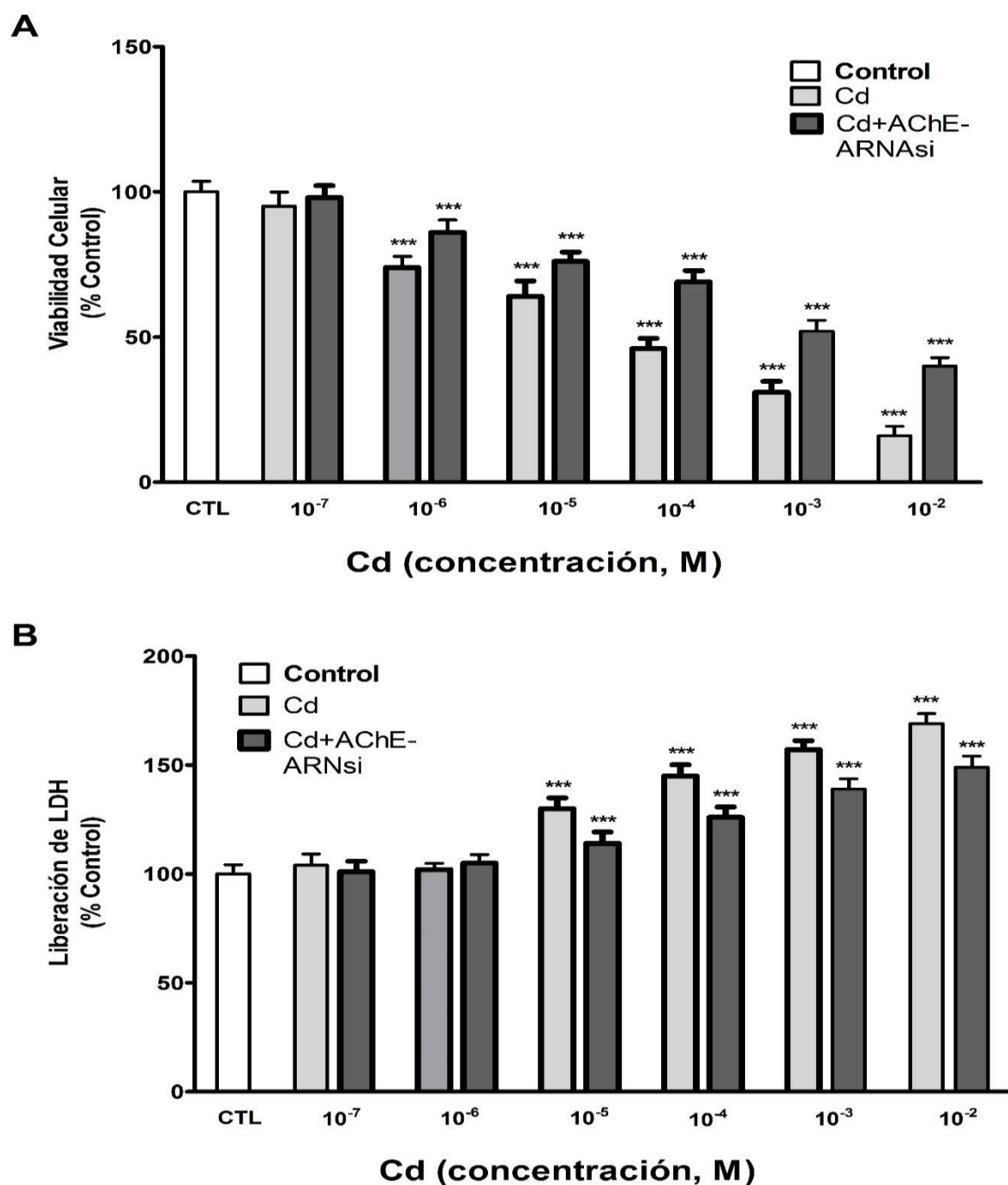
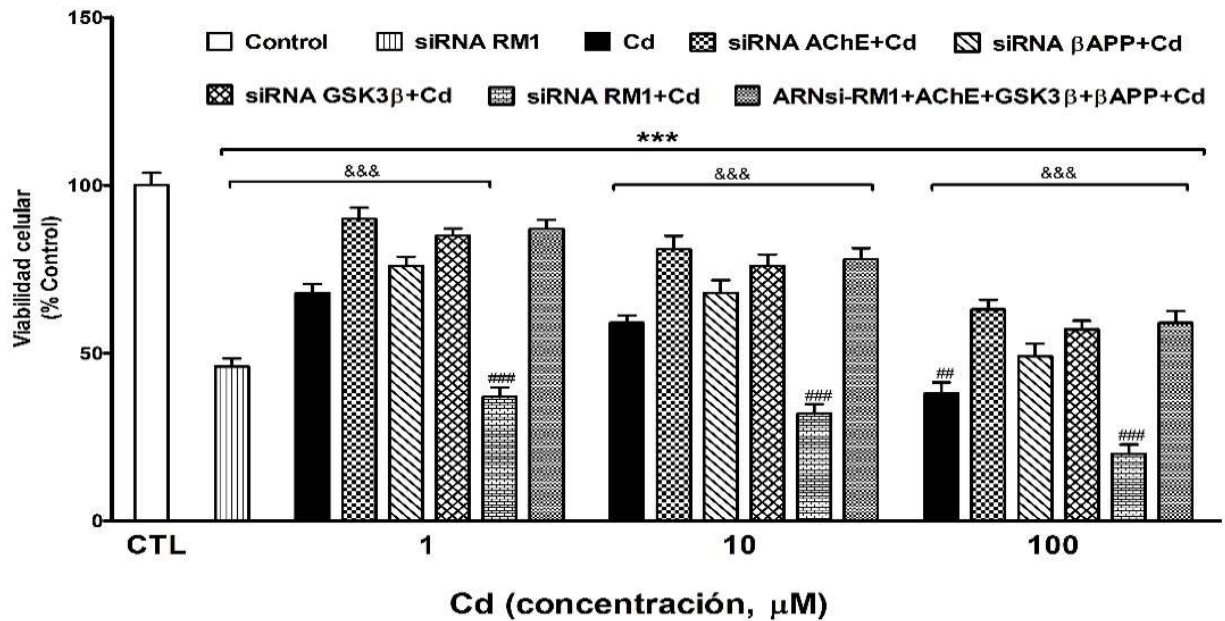


Figura 4. El efecto del cloruro de cadmio sobre la viabilidad de células SN56 silvestres o silenciadas para AChE se determinó mediante el ensayo de MTT (A) y LDH (B). Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0,001$ en comparación con el control.

A



B

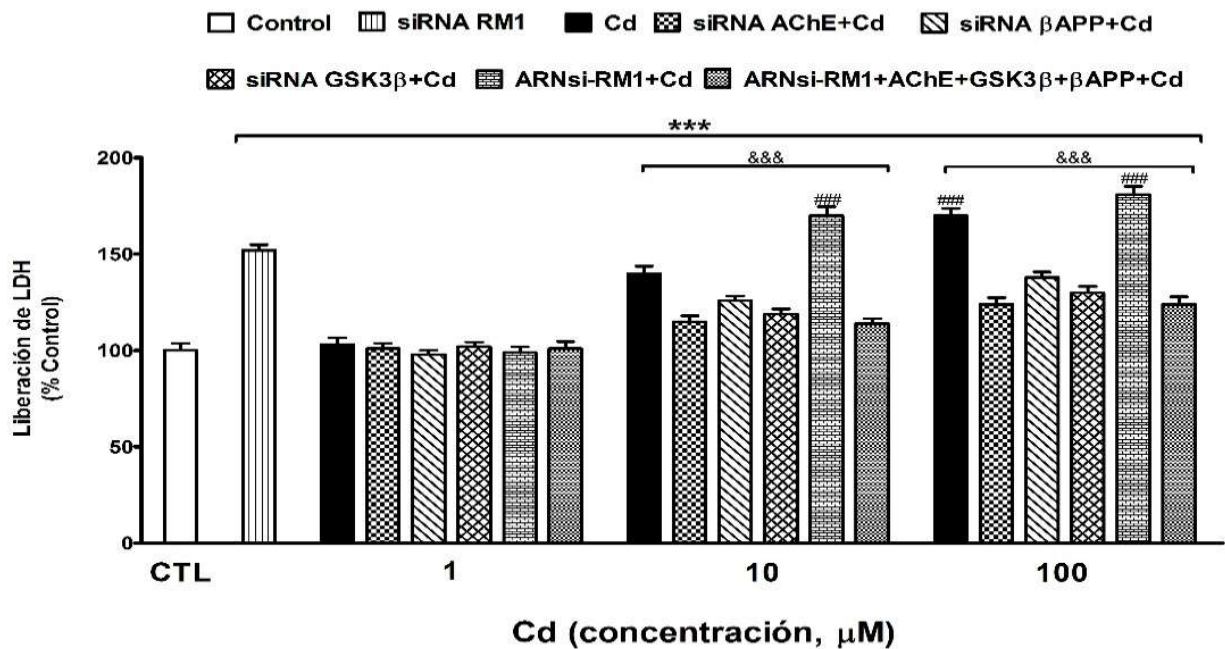


Figura 5. El efecto de cloruro de cadmio (1, 10 y 100 μM) sobre la viabilidad de las células SN56 silvestres o transfectadas, simple o simultáneamente para AChE, βAPP, RM1 y GSK-3β, se determinó mediante los ensayos de MTT (A) y LDH (B). Los valores control de la absorbancia a 562 nm fueron de $0,83 \pm 0,04$ y a 490 nm fueron de $0,21 \pm 0,03$ para los ensayos del MTT y LDH, respectivamente. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. ***p<0.001 comparado con el control; &&&p<0,001 comparado con el tratamiento con cadmio; ###p<0,001 y ##p<0,01 comparado con el silenciamiento de RM1

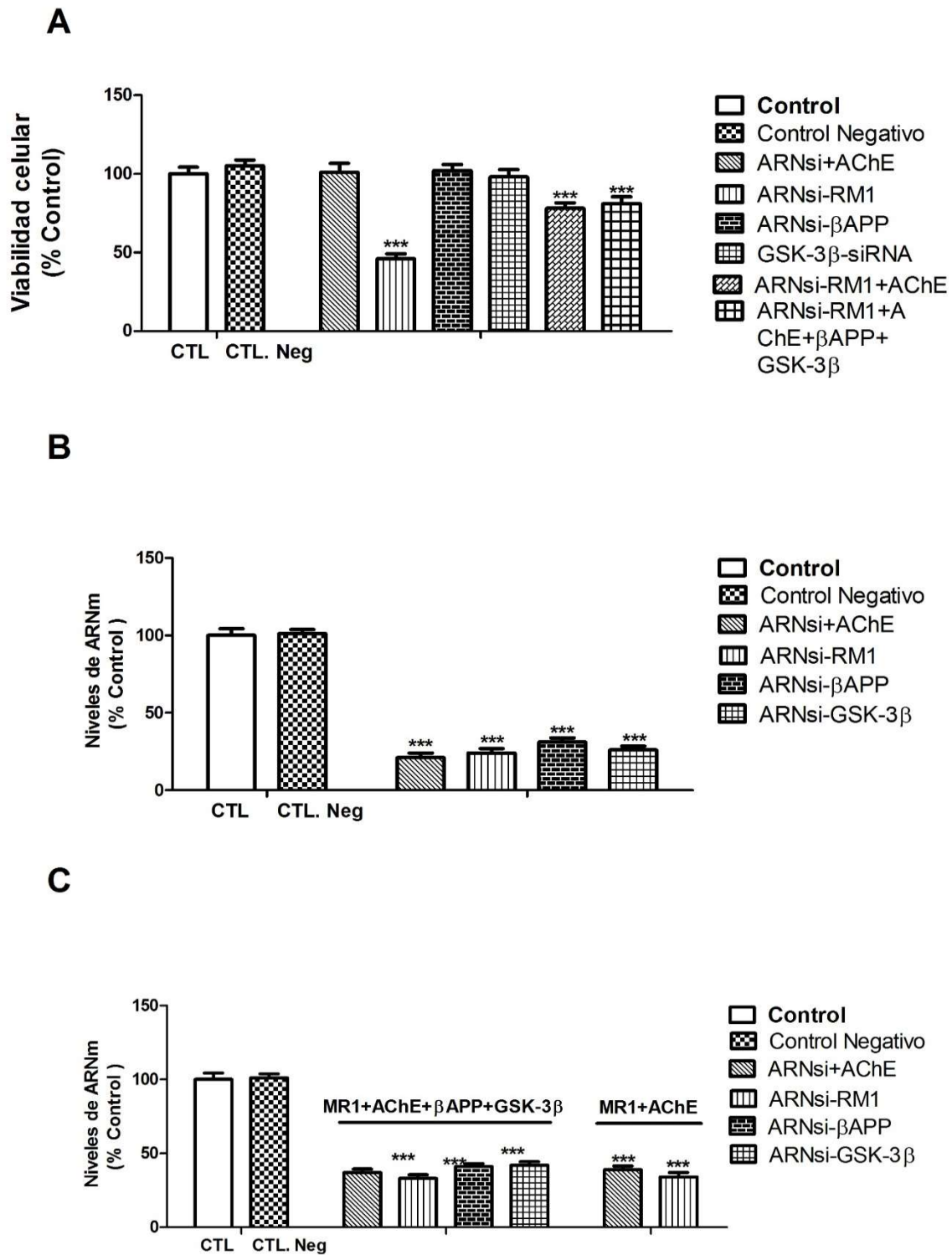


Figura 6. Efecto sobre la viabilidad celular y sobre la expresión génica de la AChE, βAPP, RM1 y GSK-3β tras su silenciamiento simple o simultáneo. (A) Efectos del silenciamiento simple o simultáneo de AChE, βAPP, RM1 y GSK-3β sobre la viabilidad celular determinados por medio del test de MTT. Silenciamiento simple (B) y simultáneo (C) de AChE, βAPP, RM1 y GSK-3β detectado por QPCR tras 48 h de la transfección. Los datos representan la media ± DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control.

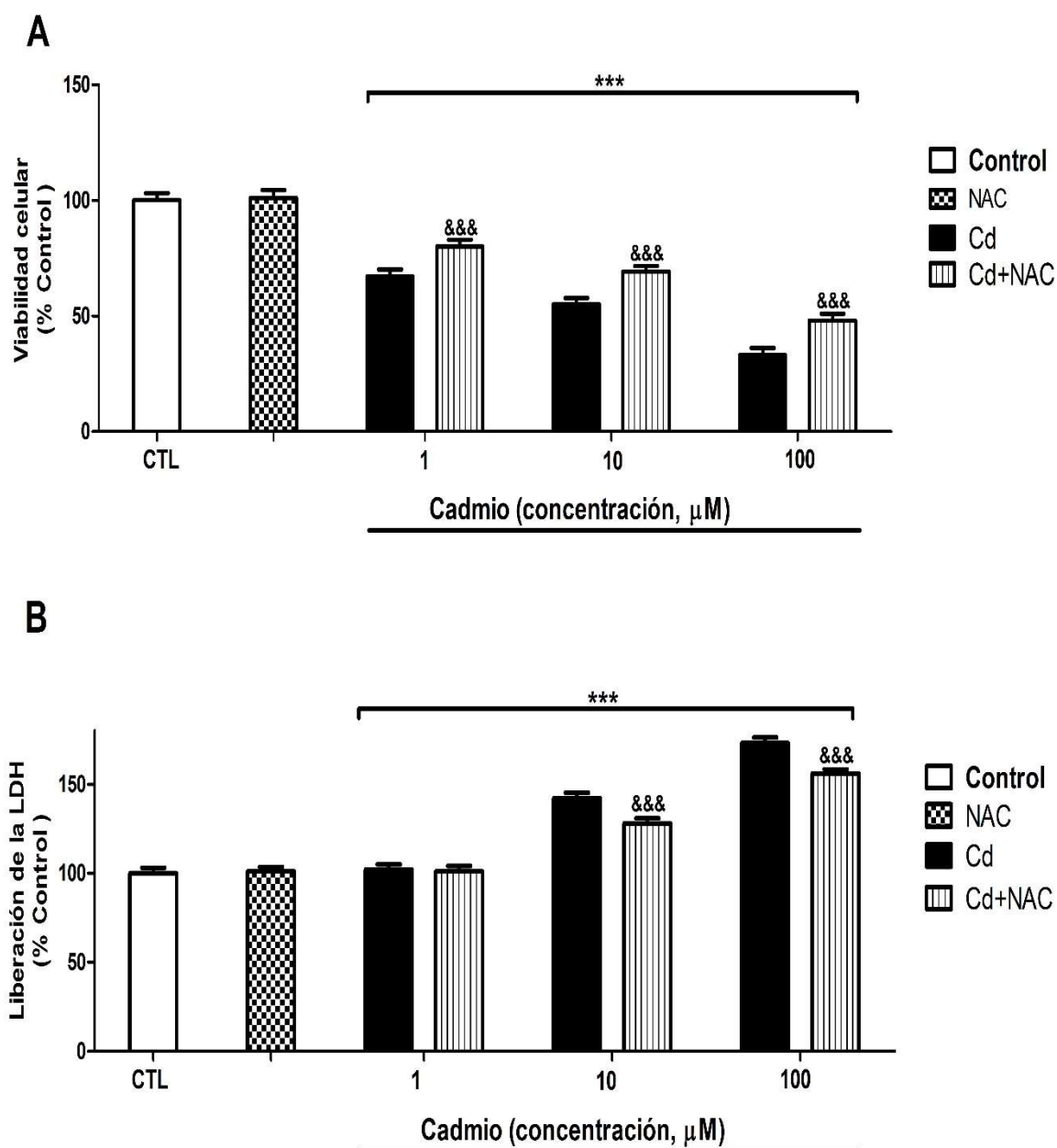


Figura 7. El efecto de cloruro de cadmio (1, 10 y 100 μM) con o sin NAC sobre la viabilidad de las células SN56 se determinó mediante los ensayos de MTT (A) y LDH (B). Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control; &&& $p < 0.001$ comparado con el tratamiento con cadmio.

Los resultados obtenidos con el ensayo de MTT se confirmaron mediante la determinación de LDH. La LDH se libera de las células como resultado de la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y es indicativa del mecanismo de muerte celular por

necrosis. En el estudio se observó un incremento de la liberación LDH al medio de cultivo de una manera concentración-dependiente cuando las células SN56 se expusieron a cloruro de cadmio en comparación con las células tratadas con vehículo (control negativo) (Figura 4B), pero este aumento comenzó a una concentración mayor (10^{-5} M) que la reducción de la viabilidad celular observada por la prueba del MTT. El tratamiento sólo con NAC no alteró la liberación de la LDH (Figura 7B). El co-tratamiento con Cd y NAC de células SN56 durante 24 h produjo una atenuación del aumento de la liberación de LDH (Figura 7B).

Por otra parte, tras el tratamiento con cadmio de células SN56 silenciadas para la AChE, se observó una menor liberación de LDH (Figura 4B). Tras el tratamiento con cadmio de células SN56 silenciadas de forma individual para AChE, RM1, β APP y GSK-3 β , se observó también una menor liberación de LDH, excepto para RM1 que fue mayor que tras el tratamiento sólo con cadmio. Tras el tratamiento con cadmio de las células silenciadas simultáneamente para RM1, AChE, β APP y GSK-3 β , se produjo un aumento concentración-dependiente la liberación de LDH, aunque fue menor que el experimentado tras el silenciamiento de RM1 o tras el tratamiento sólo con cadmio (Figura 5B). El silenciamiento de RM1 aumentó la liberación de LDH, aunque ésta fue mayor tras el tratamiento con cadmio a la concentración más alta. No hubo diferencias significativas entre los datos de las células tratadas con vehículo y las células control.

5.4. Efecto del cadmio sobre la actividad de las caspasas 3/7 en células SN56.

Se investigó la influencia del cadmio (1-100 μ M) sobre la actividad de las caspasas 3/7 en células colinérgicas septales SN56 (Figura 8). El cadmio tras 24 horas de tratamiento activó

las caspasas 3/7 en células SN56 de una manera concentración-dependiente a partir de una concentración de 1 μM en comparación con el grupo control. Además, las células silenciadas para RM1 también presentaron una inducción de las caspasas 3/7, que fue inferior a la observada en las células silenciadas para RM1 y tratadas con cadmio o tras el tratamiento con cadmio a la mayor concentración. Tras 24 h de tratamiento con cadmio de células silenciadas de forma simple para AChE, RM1, βAPP y GSK-3 β o simultánea para AChE, RM1, βAPP y GSK-3 β se produjo una activación de las caspasas 3/7 a partir de una concentración de 1 μM de una manera concentración-dependiente en comparación con el grupo de control, pero esta activación fue menor que la observada tras el tratamiento sólo con cadmio.

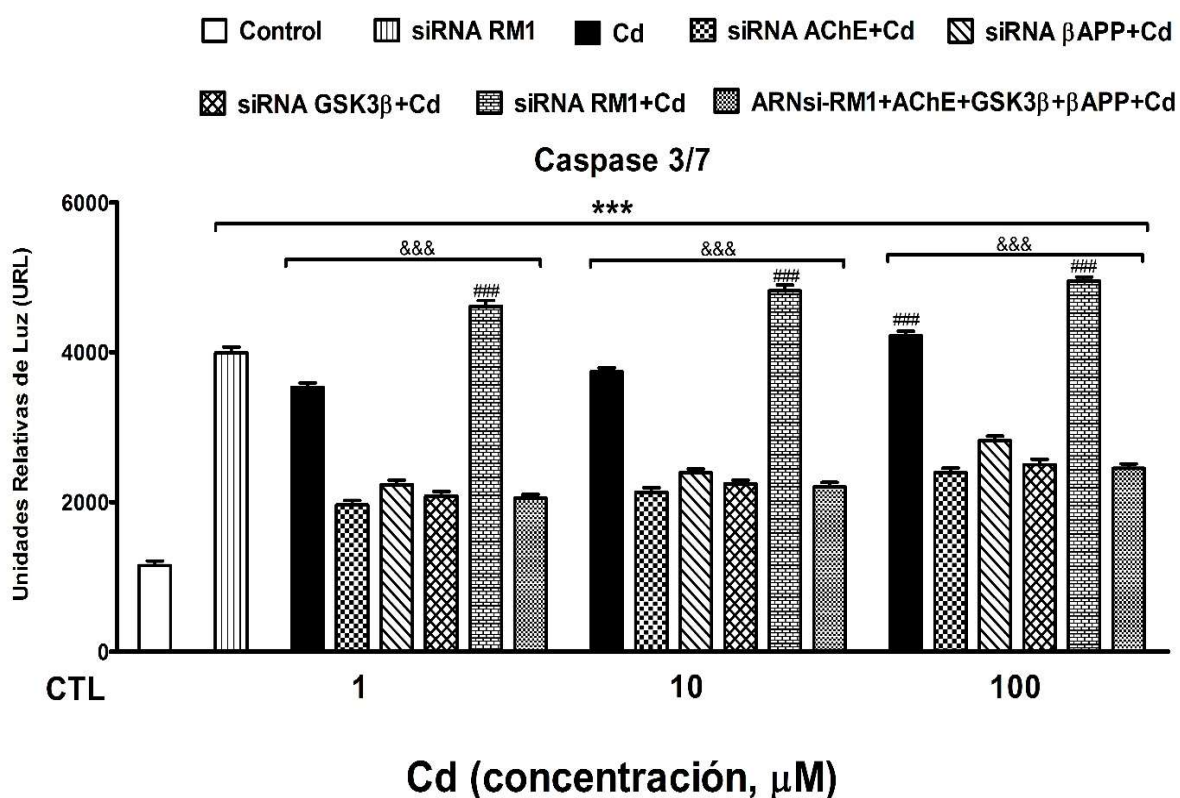


Figura 8. Análisis de las actividades de las caspasas 3/7 en células SN56 silvestres o silenciadas individual o simultáneamente para AChE, βAPP , RM1 y GSK-3 β tras el tratamiento con cadmio. Los valores se expresan como media \pm DE. ***p<0,001 comparado con el control; &&&p<0,001 comparado con el tratamiento con cadmio; ###p<0,001 comparado con el silenciamiento de RM1.

El tratamiento solo con NAC no alteró la activación de las caspasas 3/7 (Figura 7). El co-tratamiento con Cd y NAC de células SN56 durante 24 h produjo una atenuación de la activación de las caspasas observado tras el tratamiento con cadmio (Figura 9).

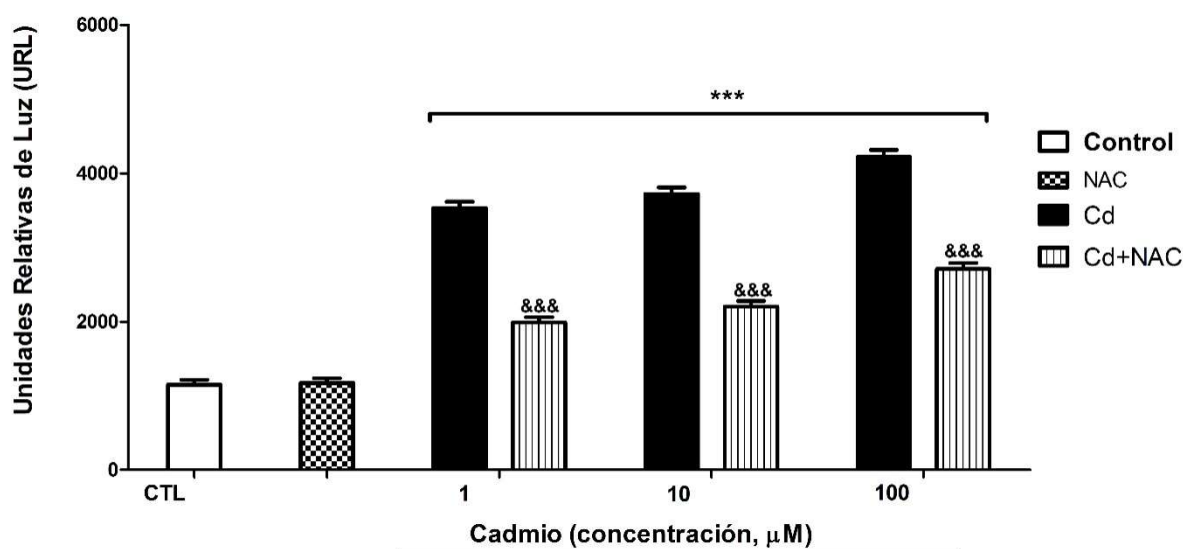


Figura 9. Análisis de la actividad de las caspasas 3/7 en células SN56 tras el tratamiento con cadmio (1, 10 y 100 μM) con o sin NAC. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control; &&& $p < 0.001$ comparado con el tratamiento con cadmio.

5.5. Efecto del cadmio sobre la actividad de la AChE y la ChAT en células SN56

Se evaluó la actividad de la AChE y la ChAT tras 24 h de exposición a cloruro de cadmio a concentraciones crecientes (10^{-7} M - 10^{-2} M) en lisados de células SN56. Se observó un aumento significativo en la actividad de la AChE desde 10^{-7} M a 10^{-5} M, pero se produjo una disminución significativa desde 10^{-4} M a 10^{-2} M en dicha enzima (Figura 10). El efecto del cadmio sobre la actividad de AChE podría ser enmascarado por la muerte celular. Los resultados se normalizaron con la concentración de proteínas, por lo que la reducción de la actividad AChE parece estar debida a un efecto directo de cadmio sobre esta enzima. La actividad de la colina acetiltransferasa se redujo de una manera concentración-dependiente en

comparación con los controles (Figura 11). El efecto del cadmio en la actividad de la ChAT, al igual que se ha comentado antes para la actividad de AChE, podría también ser enmascarado por la pérdida de células, pero como los resultados también fueron normalizados con la concentración de proteínas, la reducción de la actividad de la ChAT parece estar también debido a un efecto directo del cadmio en esta enzima.

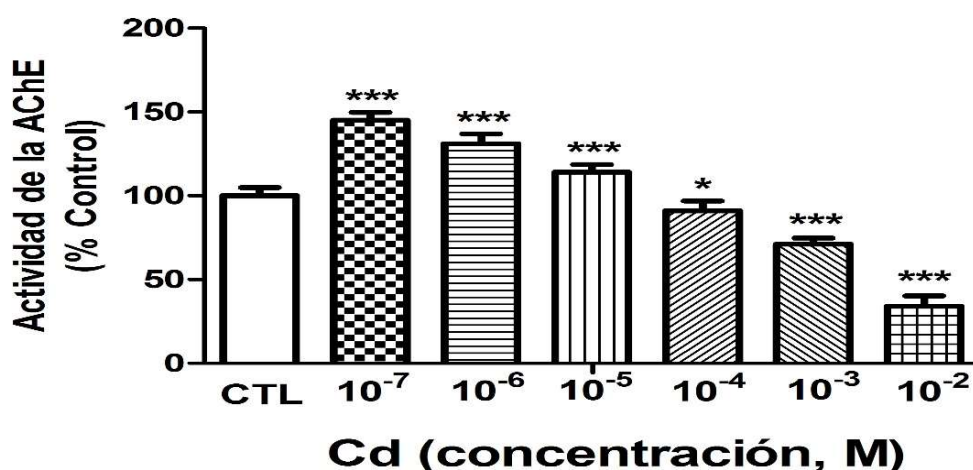


Figura 10. Efecto sobre la actividad de la AChE tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes de Cd. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. * $P < 0,05$ y *** $p < 0,001$ comparado con el control.

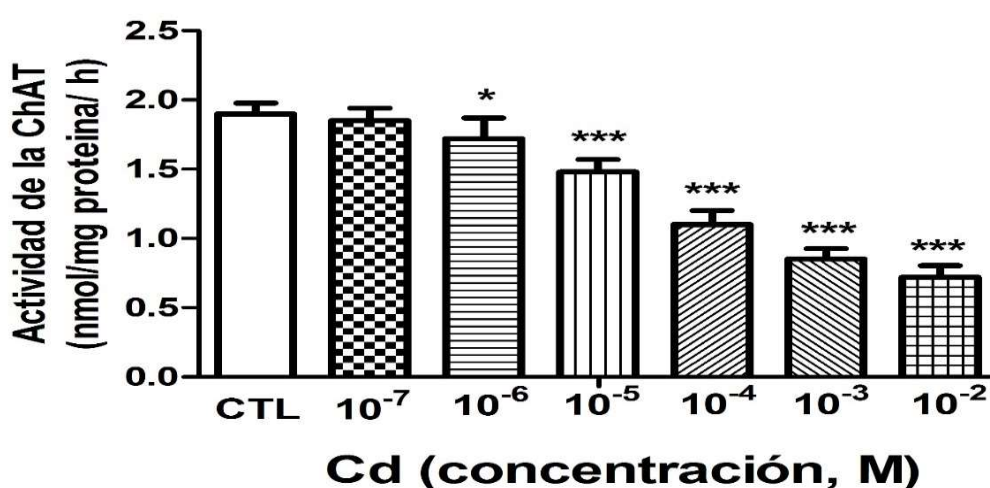


Figura 11. Efectos del cloruro de cadmio sobre la actividad de la colina acetiltransferasa en las células SN56. La actividad de la acetiltransferasa de colina se expresa como nmol de acetilcolina sintetizada por mg de proteína por h. Los resultados se representan como media \pm DE de tres cultivos independientes. * $P < 0,05$ y *** $p < 0,05$ comparado con el control.

5.6. Medición del nivel de acetilcolina en células SN56

Se midieron los niveles de ACh en el sobrenadante de los cultivos celulares tras 24 h de exposición al cloruro de cadmio a concentraciones crecientes (10^{-7} M - 10^{-2} M). Los niveles de ACh disminuyeron significativamente tras la exposición a cadmio de una manera concentración-dependiente (Figura 12). Esta reducción de los niveles de ACh podría deberse a la reducción de la viabilidad celular, pero como la actividad de ChAT se redujo, ésta es la causa más probable de esta reducción. Por otra parte, el cadmio también aumentó la actividad de AChE desde la concentración de 10^{-7} M hasta la concentración de 10^{-5} M, lo cual contribuye a la reducción de los niveles de ACh observados, pero la disminución de la actividad de AChE desde 10^{-4} M hasta 10^{-2} M debería mejorar la reducción de los niveles de ACh.

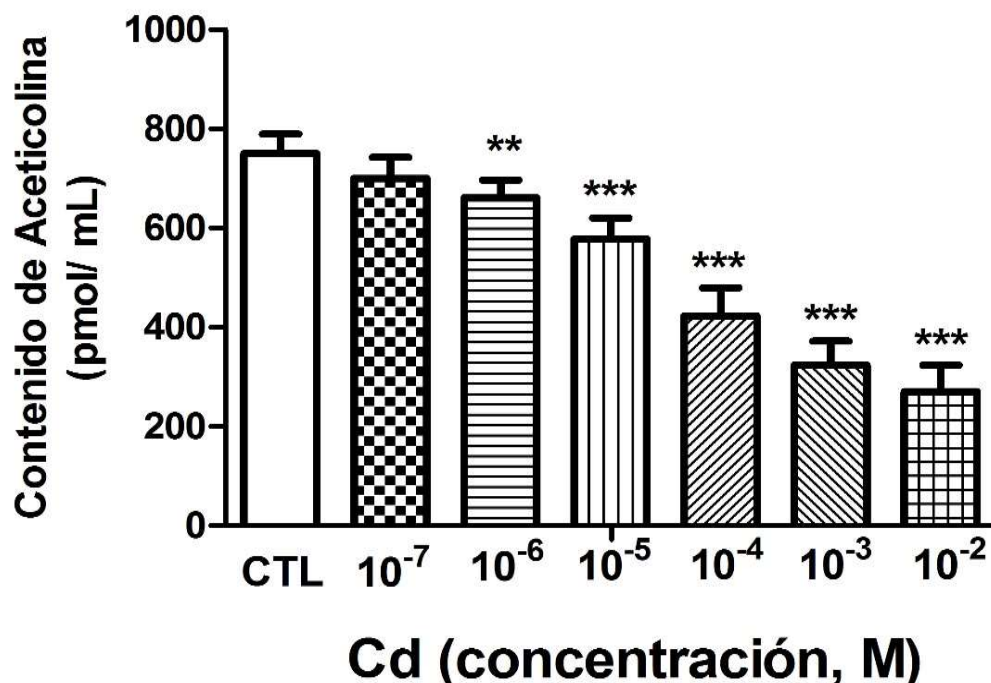


Figura 12. Efecto sobre el contenido de ACh tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes de Cd. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparado con el control.

5.7. Efecto del cadmio sobre la expresión génica de células SN56

Tras la incubación durante 24 h con diferentes concentraciones de cloruro de cadmio en células colinérgicas septales SN56, la expresión génica de AChE se indujo significativamente de una manera concentración-dependiente (Figura 13), pero no hubo modificación en la expresión de la VAcHT y ChAT (datos no mostrados). Además, se produjo una inducción de la expresión génica de AChE-S y GSK-3 β (Figuras 14A y 14C), pero la AChE-R fue significativamente reprimida de una manera concentración-dependiente (Figura 14B). El tratamiento sólo con NAC no alteró la expresión génica de AChE-S, AChE-R y GSK-3 β (Figura 15). El co-tratamiento con Cd y NAC de células SN56 durante 24 h produjo una atenuación parcial del aumento de la expresión de la expresión génica de AChE-S y GSK-3 β (Figuras 15A y 15C), y de la represión de AChE-R observado después del tratamiento individual con Cd (Figura 15B).

El silenciamiento del RM1 indujo la expresión génica de GSK-3 β (Figura 16C) y de AChE-S (Figura 16A), y reprimió la expresión génica de AChE-R (Figura 16B). El tratamiento con cadmio durante 24 h de células silenciadas para RM1 indujo un mayor aumento en la expresión de los genes GSK-3 β y AChE-S y una mayor reducción de la expresión génica de la AChE-R que la observada tras el tratamiento sólo con cadmio o el silenciamiento sólo de RM1 (Figura 16A-C). El silenciamiento simultáneo de RM1 y AChE atenuó la inducción de la expresión de GSK-3 β observada tras el silenciamiento único de RM1 (Figura 16C). El tratamiento con cadmio de células silenciadas para AChE indujo un mayor porcentaje de atenuación de la inducción de la expresión del gen GSK-3 β observada tras el silenciamiento simultáneo de RM1 y AChE (Figura 16C). El tratamiento con cadmio de células silenciadas simultáneamente para AChE y RM1 resultó en una mayor reducción en el porcentaje de

inducción de GSK-3 β que la observada tras el tratamiento con cadmio de células silenciadas para AChE (Figura 16C). El co-tratamiento con cadmio y NAC de las células silenciadas para RM1 produjo una atenuación de la sobreexpresión de los genes GSK-3 β y AChE-S y de la reducción de la expresión génica de la AChE-R observada tras el tratamiento sólo con cadmio. La atenuación observada tras el co-tratamiento con cadmio y NAC de las células silenciadas para RM1 fue menor que el observado tras el tratamiento con cadmio y NAC de las células SN56 silvestres. La transfección de células con ARN de silenciamiento control no produjo ningún efecto sobre la expresión de RM1, AChE, GSK-3 β y β APP (Figuras 6B y 6C).

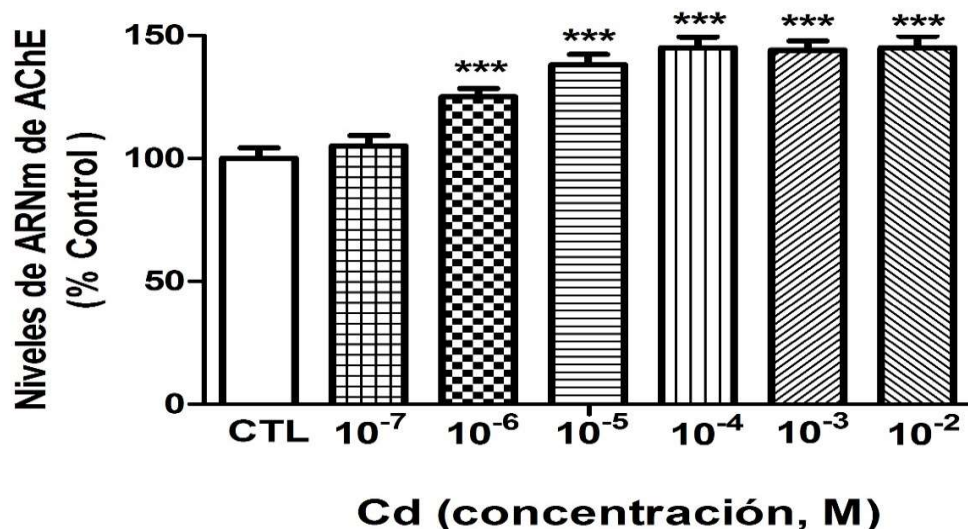


Figura 13. Efecto sobre la expresión génica de AChE tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes de Cd. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control.

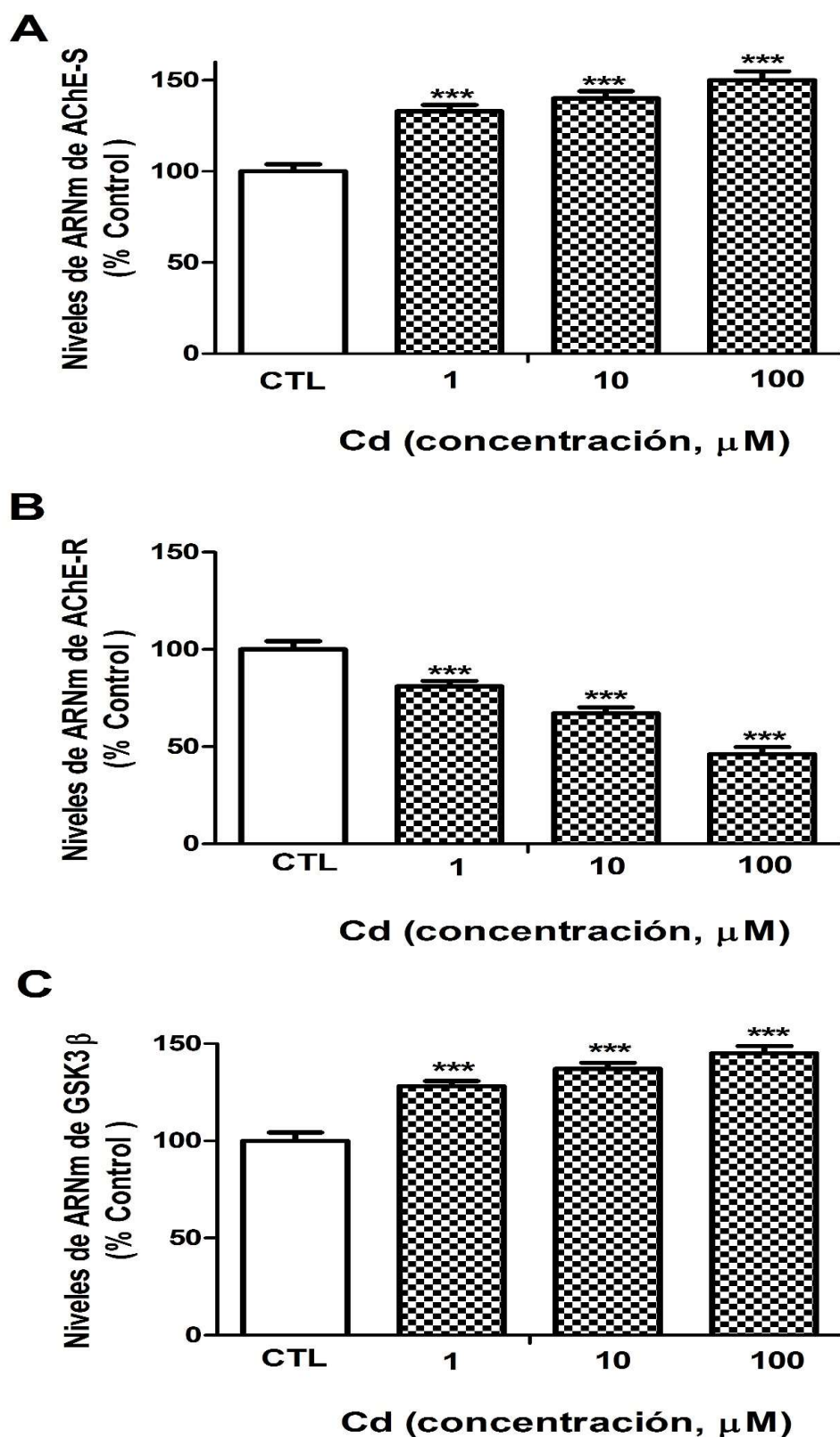


Figura 14. Efecto sobre la expresión génica de AChE-S (A), AChE-R (B) y GSK-3 β (C) tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes de Cd. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control.

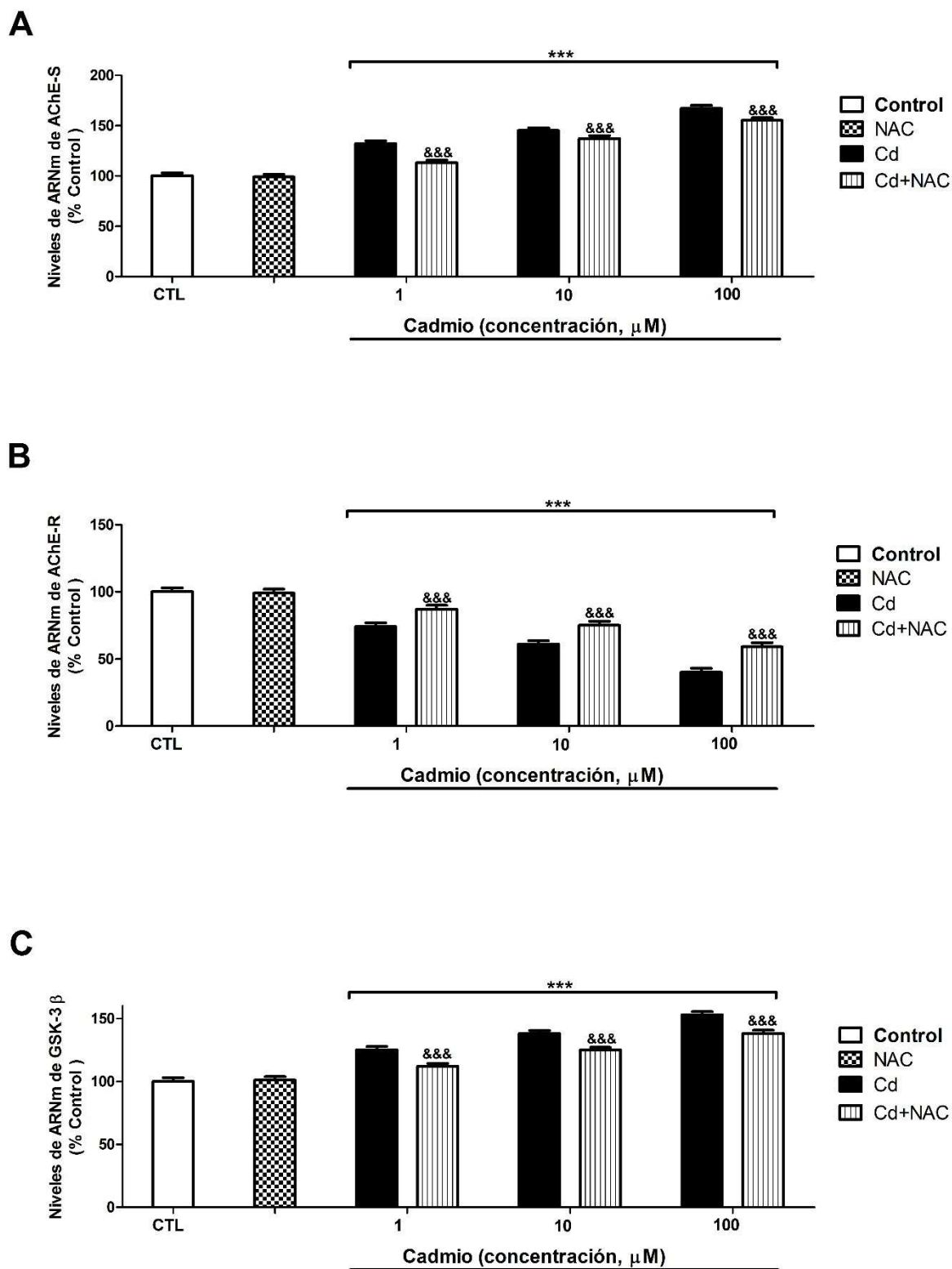


Figura 15. Efecto sobre la expresión génica de AChE-S (A), AChE-R (B) y GSK-3 β (C) tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes de Cd con o sin NAC. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control; &&& $p < 0.001$ comparado con el tratamiento con cadmio.

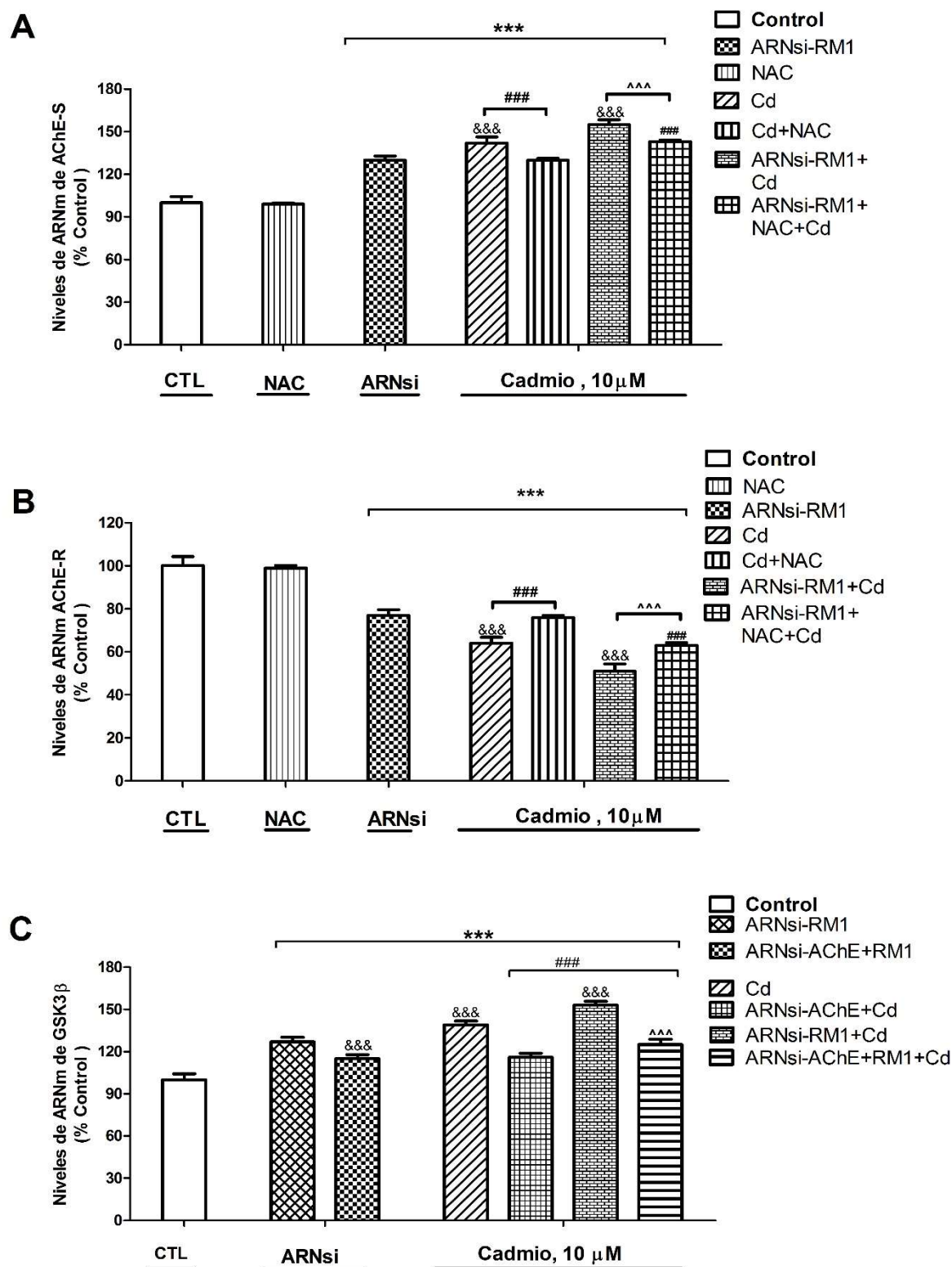


Figura 16. Efecto sobre la expresión génica de AChE-S (A), AChE-R (B) y GSK-3 β (C) tras el silenciamiento de RM1, el tratamiento con cadmio (10 μ M), o el tratamiento con cadmio de células silenciadas para RM1. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control; &&& $p < 0.001$ comparado con el silenciamiento de RM1; ### $p < 0.001$ comparado con el tratamiento con cadmio; ^^^ $p < 0.001$ comparado con el tratamiento con cadmio de células silenciadas para RM1.

5.8. Efecto del cadmio sobre el receptor muscarínico M1 en células SN56

El bloqueo de los receptores muscarínicos M1 en las células SN56 se midió tras una exposición de 24 horas al cloruro de cadmio a concentraciones crecientes (1-100 μM). El porcentaje de unión a los receptores muscarínicos M1 de la [^3H] pirenzepina, antagonista selectivo de dichos receptores, se redujo significativamente de forma concentración-dependiente cuando se co-trataron con cadmio, alcanzando hasta el 58% de bloqueo de los receptores muscarínicos M1 a la concentración más alta estudiada. El efecto del cadmio podría ser enmascarado por la pérdida de células, pero como los resultados se normalizaron con la concentración de proteínas, el efecto observado parece ser debido a un efecto directo del cadmio sobre este receptor (Figura 17). Por otra parte, el tratamiento con NAC de las células SN56 no altero el porcentaje de unión a los receptores muscarínicos M1 de la [^3H] pirenzepina. Además, el co-tratamiento con cadmio y NAC de células SN56 durante 24 h produjo una reducción del bloqueo de los receptores muscarínicos M1 inducido por el tratamiento sólo con cadmio (Figura 17).

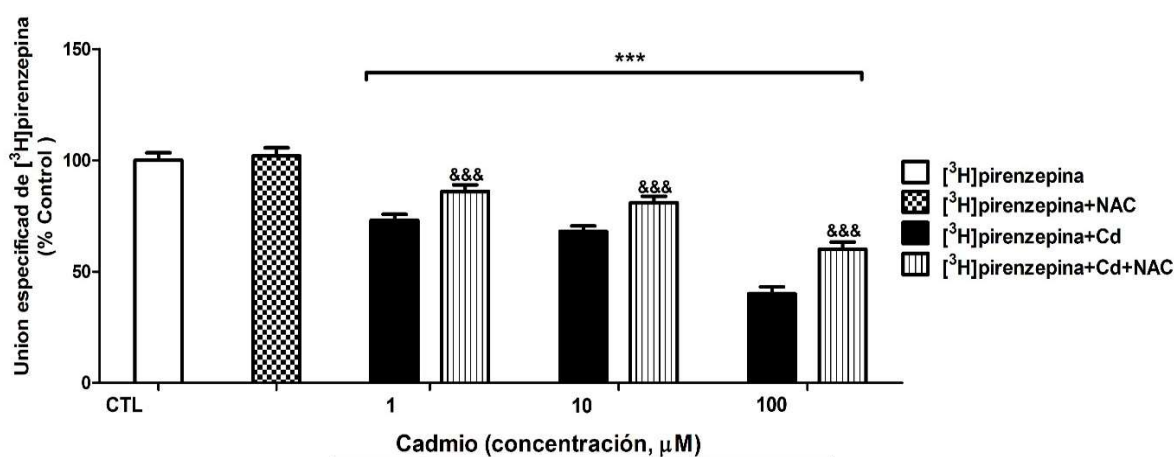


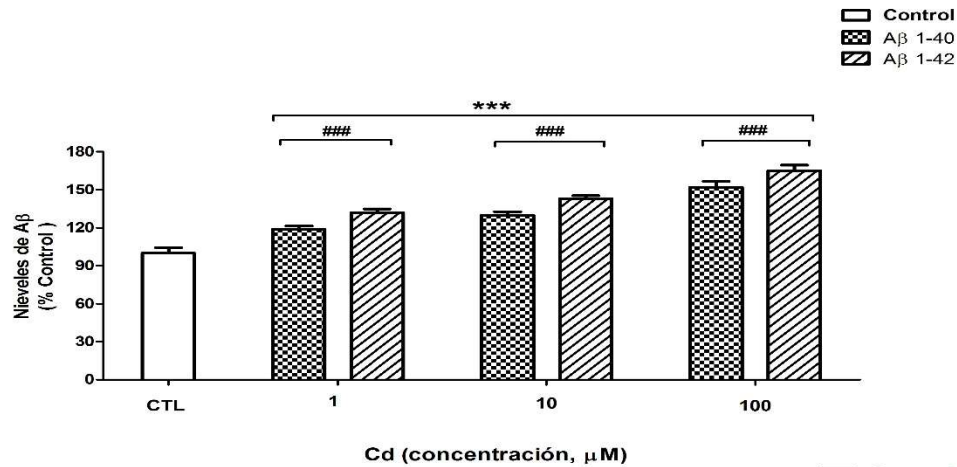
Figura 17. Inhibición *in vitro* de la unión de la [^3H] pirenzepina (10 nM) al receptor muscarínico M1 después de 24 horas de tratamiento con cadmio (1, 10 y 100 μM) con o sin NAC. Los valores control de la unión del cadmio al receptor fueron $5,56 \pm 0,11$. Los resultados se presentan como media \pm DE de los experimentos realizados por triplicado. *** $p < 0,01$ comparado con el control; &&& $p < 0,001$ comparado con el tratamiento de Cd.

5.9. Efecto del cadmio sobre el contenido de las proteínas A β y Tau en células SN56

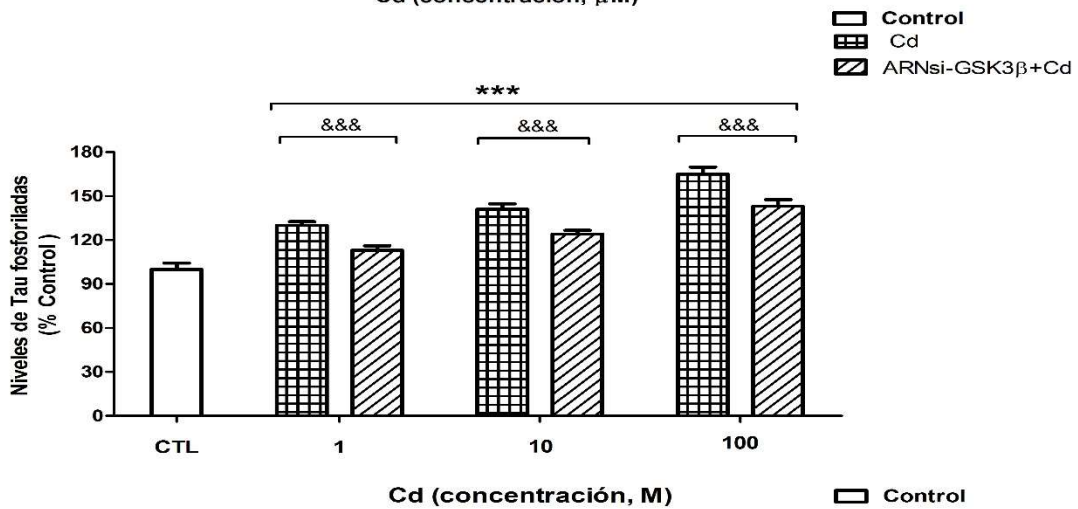
El tratamiento con cadmio durante 24 horas de células colinérgicas SN56 aumentó los niveles de las proteínas A β 1-40, A β 1-42 y Tau totales y fosforiladas de una manera concentración-dependiente (Figura 18A-C). El aumento en las proteínas A β 1-42 fue mayor que en las A β 1-40 (Figura 18A). El tratamiento sólo con NAC no alteró la concentración de estas proteínas. El co-tratamiento con cadmio y NAC de células SN56 durante 24 horas produjo una atenuación parcial del aumento de dichas proteínas, frente al observado después del tratamiento individual con cadmio (Figura 19A-D). Además, el aumento en las proteínas Tau totales y fosforiladas se redujo tras el tratamiento con cadmio de células silenciadas para GSK-3 β (Figura 18B y 18C).

El silenciamiento del RM1 o el tratamiento sólo con cadmio, aumentó los niveles de las proteínas A β 1-40, A β 1-42 (Figuras 20A y 20B), Tau totales y fosforiladas (Figuras 21A y 21B), mostrando un mayor incremento en las células tratadas sólo con cadmio. El tratamiento con cadmio de células silenciadas para RM1 aumentó más los niveles de estas proteínas que sólo el silenciamiento de RM1 (Figuras 20 y 21). El silenciamiento simultáneo de AChE y RM1 atenuó el aumento observado de estas proteínas tras el silenciamiento único de RM1. El tratamiento con cadmio de células silenciadas para AChE también atenuó el aumento observado de estas proteínas tras el tratamiento sólo con cadmio, pero el porcentaje de atenuación fue mayor que el observado tras el silenciamiento simultáneo de AChE y RM1. Además, el tratamiento con cadmio de células silenciadas simultáneamente para AChE y RM1 atenuó el aumento observado en estas proteínas tras el tratamiento con cadmio de células silenciadas para RM1, pero este porcentaje de atenuación fue mayor que el observado tras el tratamiento con cadmio de células silenciadas para AChE (Figuras 20 y 21).

A



B



C

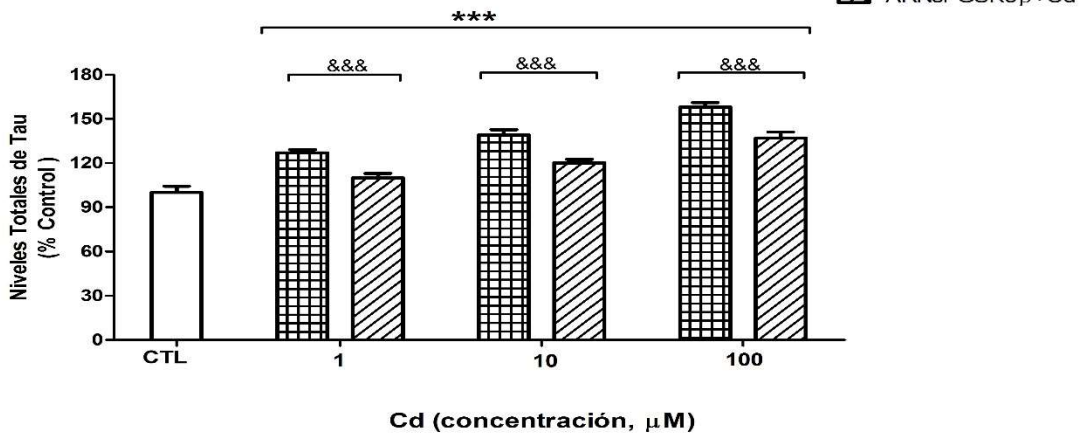


Figura 18. Evaluación del efecto de cadmio sobre los niveles de proteínas A β 1-40, A β 1-42, Tau totales y fosforiladas en células SN56 silvestres o transfectadas. Los valores control de A β 1-40, A β 1-42, Tau totales y fosforiladas fueron $31,36 \pm 0,21$; $42,19 \pm 0,24$; $74600 \pm 42,22$ y $324000,56 \pm 41,32$ pg/ml, respectivamente. Los resultados se normalizaron con el contenido de proteínas totales y se representaron como porcentaje con respecto al control. *** $p < 0,001$ comparado con el control; &&& $p < 0,001$ comparado con el tratamiento con cadmio; ### $p < 0,001$ comparado con los niveles de A β 1-40.

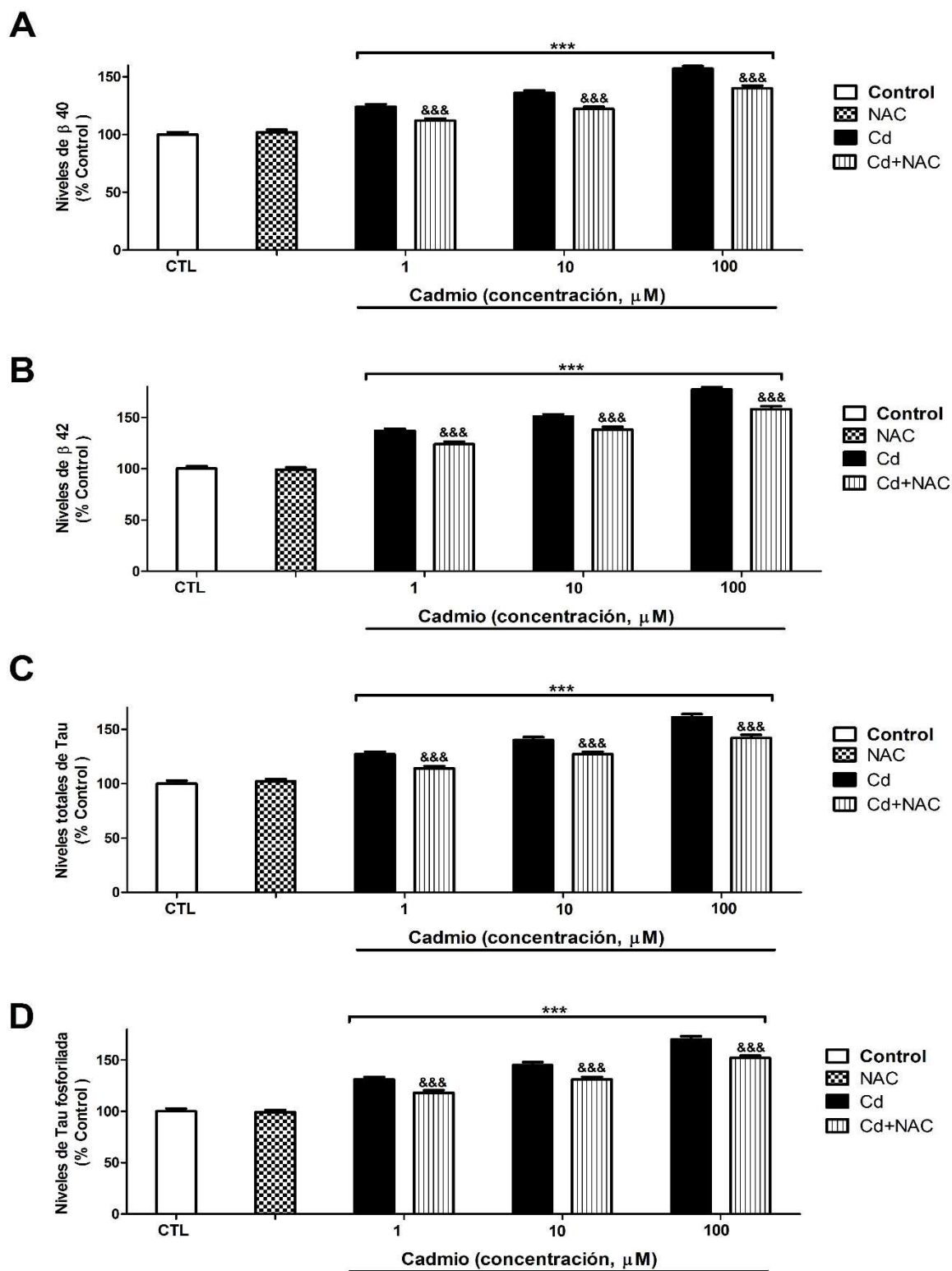
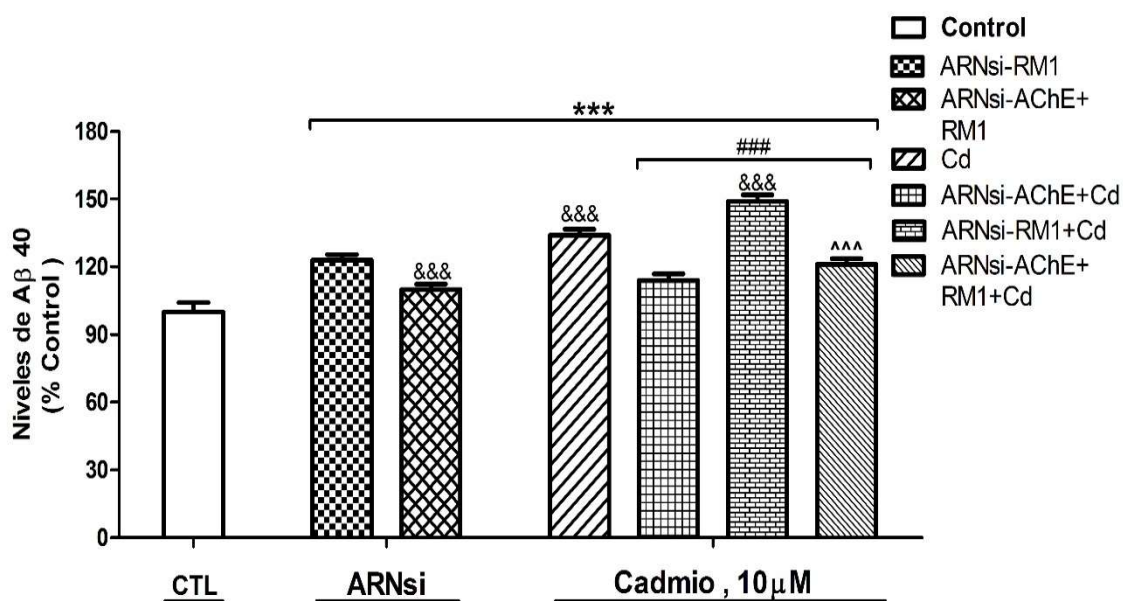


Figura 19. Evaluación del efecto de cadmio sobre los niveles de proteínas A β 1-40 (A), A β 1-42 (B), Tau totales (C) y fosforiladas (D) en células SN56. Los resultados se normalizaron con el contenido de proteínas totales y se representaron como porcentaje con respecto al control. ***p<0.001 comparado con el control; &&&p<0,001 comparado con el tratamiento con cadmio.

A



B

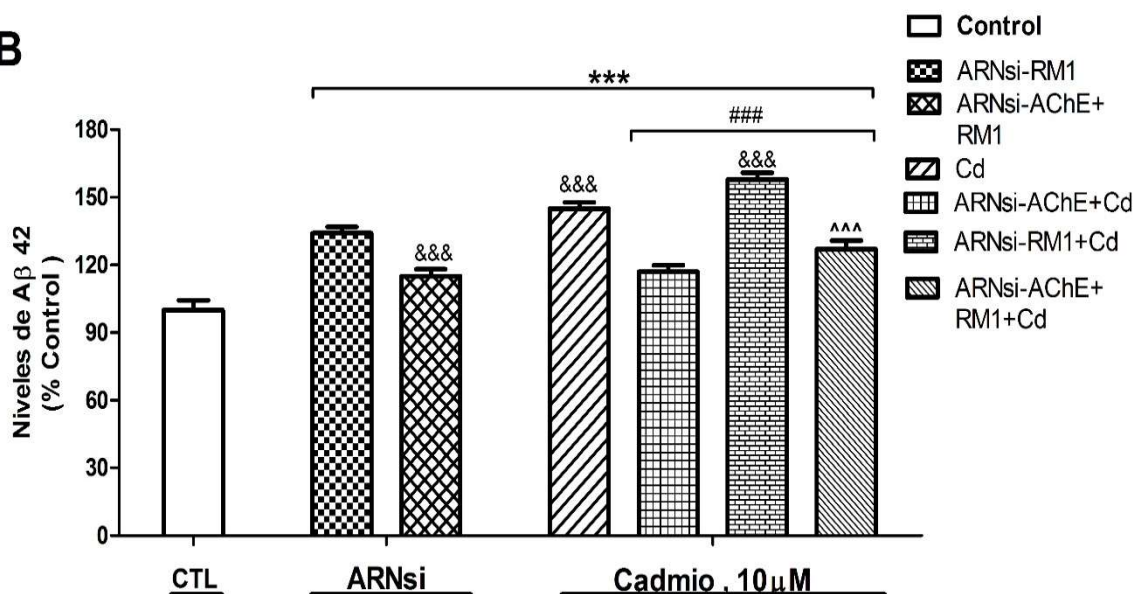
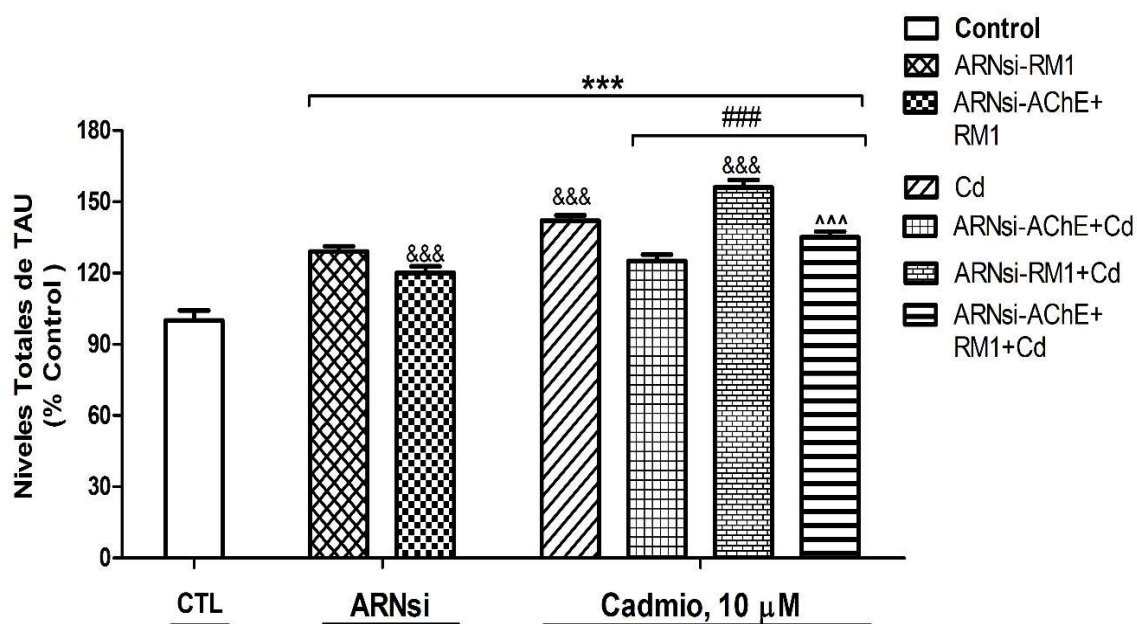


Figura 20. Evaluación del efecto de cadmio en los niveles de (A) Aβ 1-40 y (B) Aβ 1-42 en células SN56 silvestres o transfectadas. Los resultados se normalizaron con el contenido de proteínas totales y se presentaron como porcentaje respecto al control. ***p<0.001 comparado con el control; &&&p<0.001 comparado con el silenciamiento de RM1; ###p<0.001 comparado con el tratamiento con cadmio; ^^^p<0.001 comparado con el tratamiento con cadmio de células silenciadas para AChE

A



B

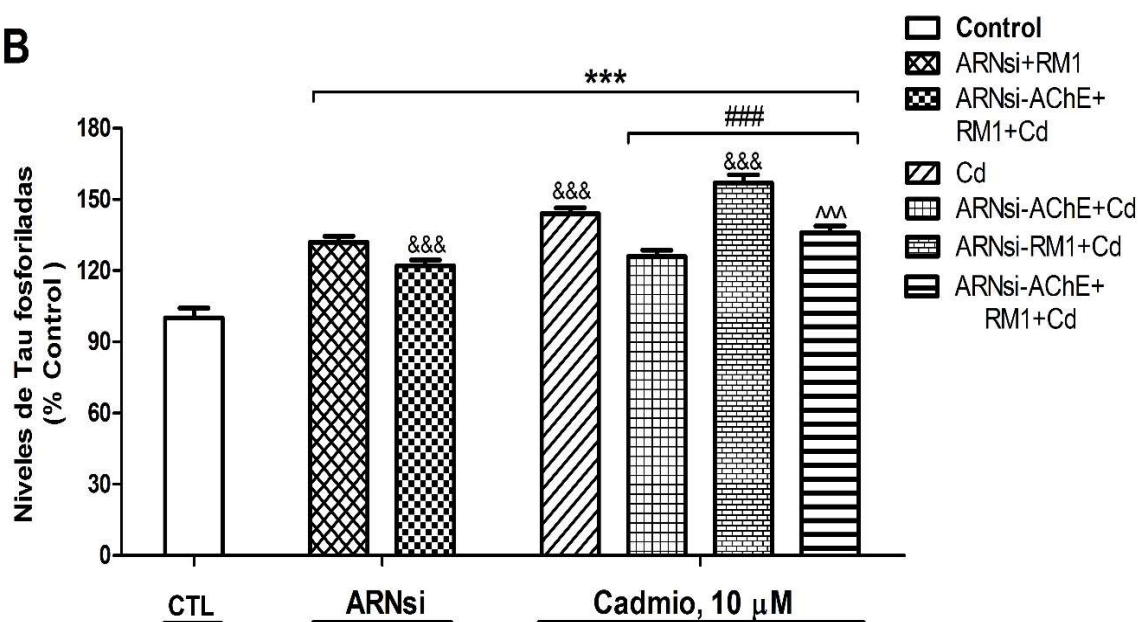


Figura 21. Evaluación del efecto de cadmio en los niveles de proteínas (A) Tau totales y (B) Tau fosforiladas en células SN56 silvestres o transfectadas. Los resultados se normalizaron con el contenido de proteínas totales y se presentaron como porcentaje respecto al control. *** $p < 0.001$ comparado con el control; &&& $p < 0.001$ comparado con el silenciamiento de RM1; ### $p < 0.001$ comparado con el tratamiento con cadmio; ^^^ $p < 0.001$ comparado con el tratamiento con cadmio de células silenciadas para AChE

5.10. Efecto del cadmio sobre la actividad de ChAT en células SN56

Los resultados de la medición de la actividad de la ChAT en células SN56 tras 24 horas de tratamiento con cadmio con o sin NAC o vehículo se muestran en la Figura 22. El tratamiento con cadmio produjo una disminución concentración-dependiente de la actividad de la ChAT. El tratamiento solo con NAC no altero la actividad de la ChAT. Además, el co-tratamiento con cadmio y NAC de células SN56 durante 24 h produjo una atenuación parcial de la disminución de la actividad de la ChAT observada después del tratamiento individual con cadmio (Figura 22).

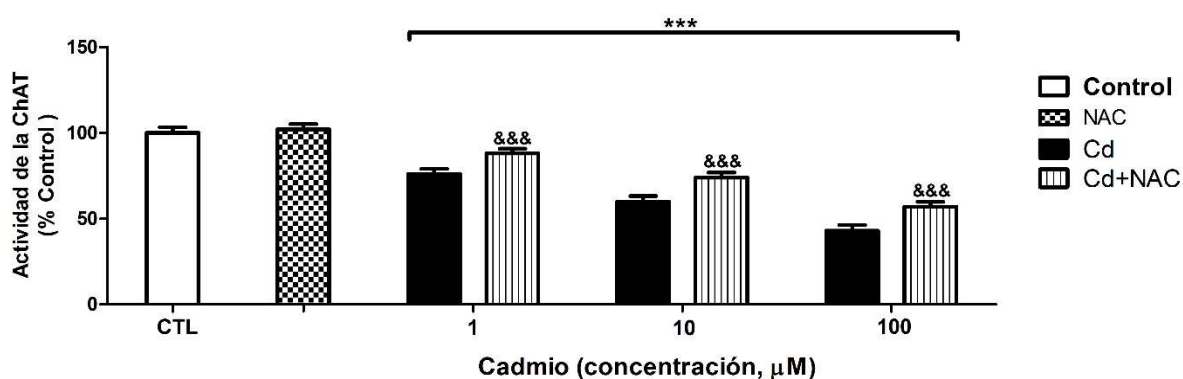


Figura 22. Efectos del cadmio sobre la actividad de la colina acetiltransferasa en células SN56. La actividad de la colina acetiltransferasa se expresa como nmol de acetilcolina sintetizada por mg de proteína por h. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control. &&& $p < 0.001$ comparado con el tratamiento de Cd.

Por otra parte, en la Figura 23 se muestran los efectos del tratamiento con cadmio sobre la actividad de la ChAT en células SN56 silvestres y silenciadas para RM1 y AChE. En comparación con los controles, la actividad de la colina acetiltransferasa disminuyó tras el silenciamiento del RM1 o tras el tratamiento con cloruro de cadmio, siendo la reducción más

pronunciada con el tratamiento con cadmio (Figura 23). El tratamiento con cadmio de las células silenciadas para RM1 redujo la actividad de la ChAT en mayor medida que el silenciamiento solo del RM1. El tratamiento con cadmio de células silenciadas para AChE revirtió parcialmente la reducción de la actividad de la ChAT inducida tras el tratamiento sólo con cadmio. El silenciamiento simultáneo de AChE y RM1 redujo parcialmente la disminución en la actividad de la ChAT inducida por el silenciamiento único de RM1. El tratamiento con cadmio de células silenciadas simultáneamente para AChE y RM1 redujo parcialmente la disminución de la ChAT, pero esta reducción fue menor que la inducida tras el tratamiento con cadmio de células silenciadas para AChE. Los efectos sobre la actividad de la ChAT podrían estar enmascarados por la pérdida de células, pero como los resultados también se normalizaron con la concentración de proteínas, parece que la reducción de la actividad de la ChAT también se debió a un efecto directo del cadmio o del silenciamiento de RM1 sobre esta enzima.

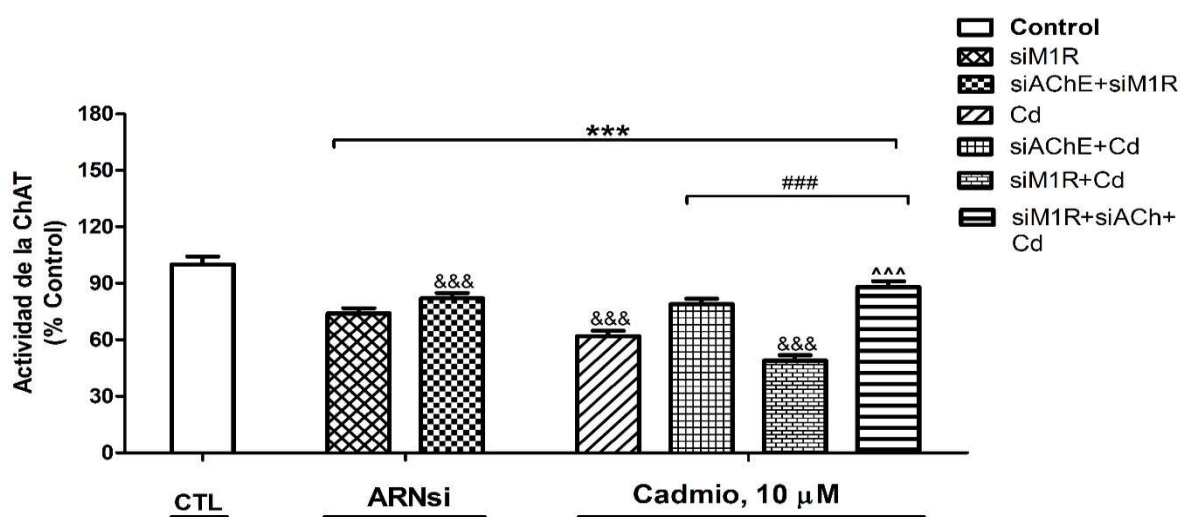


Figura 23. Efectos del cloruro de cadmio sobre la actividad de la colina acetiltransferasa en células SN56 silvestres y transfectadas. La actividad de la colina acetiltransferasa se expresa como nmol de acetilcolina sintetizada por mg de proteína por h. Los resultados se presentan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. Los resultados se normalizaron con el contenido de proteínas totales y se presentaron como porcentaje respecto al control. *** $p < 0,001$ comparado con el control; &&& $p < 0,001$ comparado con el silenciamiento de RM1; ### $p < 0,001$ comparado con el tratamiento con cadmio; ^^^ $p < 0,001$ comparado con el tratamiento con cadmio de células silenciadas para AChE.

5.11. Efecto del cadmio sobre la inducción de peroxidación lipídica en células SN56

La peroxidación lipídica se midió en las células SN56 después de la exposición durante 24 horas a concentraciones crecientes de cadmio (1-100 μM). El tratamiento con cadmio indujo un aumento en los niveles de MDA en una manera concentración-dependiente, en comparación con el grupo control, lo que indica el aumento de la peroxidación lipídica (Figura 24). Por otra parte, el tratamiento con NAC no indujo un aumento en los niveles de MDA. Por último, el co-tratamiento con cadmio y NAC de células SN56 durante 24 horas produjo una atenuación completa del aumento de los niveles de MDA observados después del tratamiento individual con cadmio (Figura 24).

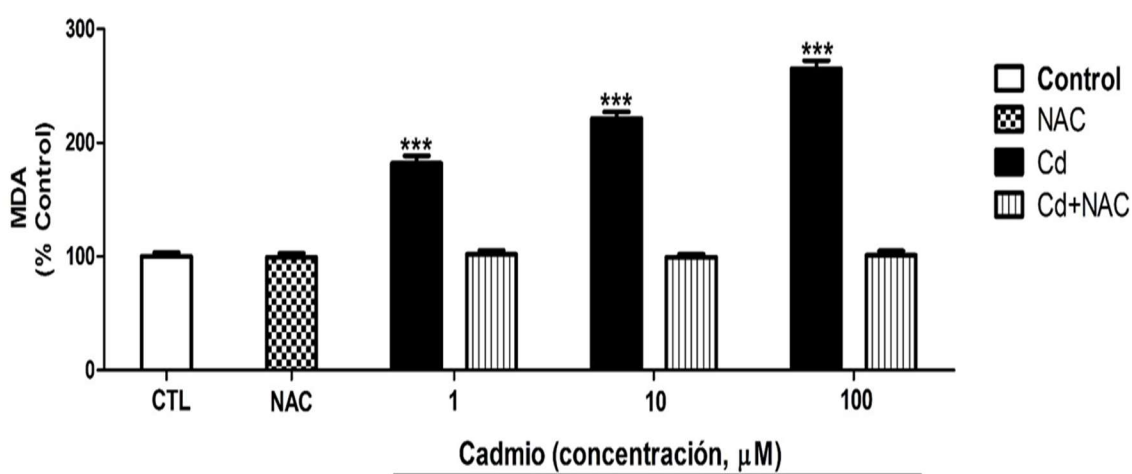


Figura 24. Efecto sobre el contenido de MDA tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes de Cd. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control. &&& $p < 0.001$ comparado con el tratamiento de Cd.

5.12. Efecto del cadmio sobre los niveles de peróxido de hidrógeno en células SN56

El H_2O_2 es un subproducto metabólico de oxígeno reactivo que sirve como un regulador clave de una serie de estados relacionados con el estrés oxidativo. Tras 24 horas de tratamiento con cadmio, el contenido de peróxido de hidrógeno aumentó de una manera concentración-dependiente, en comparación con el grupo control (Figura 25).

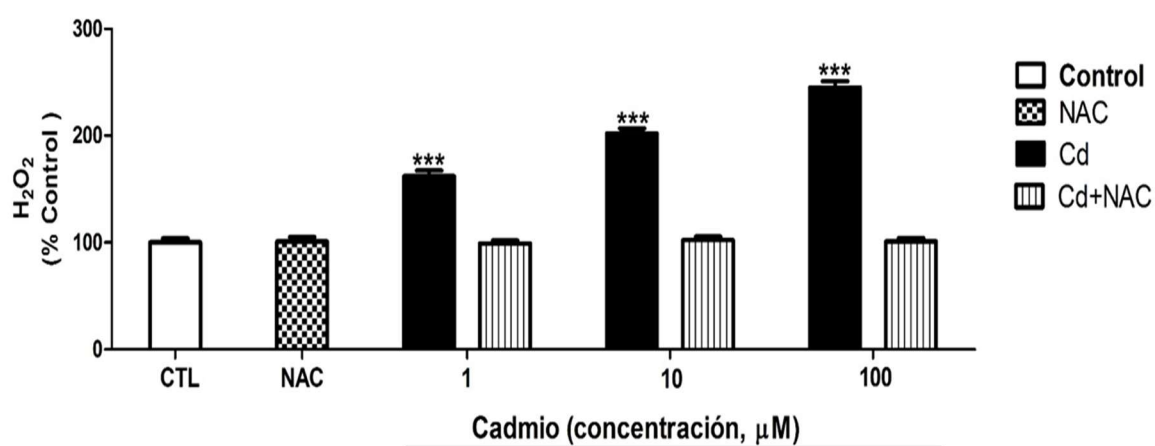


Figura 25. Efecto sobre el contenido de H_2O_2 tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes de Cd. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control. &&& $p < 0.001$ comparado con el tratamiento de Cd.

El tratamiento con NAC no indujo ningún efecto sobre el contenido de H_2O_2 . Finalmente, el co-tratamiento con cadmio y NAC de las células SN56 durante 24 h produjo una atenuación completa del aumento del contenido de H_2O_2 observado después del tratamiento individual con cadmio (Figura 25).

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

6. DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que el cadmio indujo muerte celular, de una manera concentración-dependiente, en el cultivo primario neuronal empleado procedente de la región del prosencéfalo basal, siendo este efecto más pronunciado sobre las neuronas AChE positivas, lo que indica que las neuronas colinérgicas son más sensibles a la toxicidad del cadmio. Recientemente, se ha descrito que el cadmio presenta una acción toxica selectiva sobre el sistema colinérgico periférico. En este sentido, se ha demostrado que la exposición crónica al cadmio altera la contractilidad del músculo detrusor de rata, produciendo una disminución significativa sólo en el componente colinérgico de su contracción en respuesta a la estimulación del campo eléctrico (Bayazit et al., 2002). Además, se ha descrito que el tratamiento con cadmio (10 μ M y 100 μ M) de explantes de médula espinal fetal humana cultivada durante 24 horas produce una pérdida selectiva de neuronas motoras colinérgicas en los cuernos ventrales de la médula espinal, mientras no se observa pérdida neuronal en el ganglio de la raíz dorsal (Sarchielli et al., 2012), lo que sugiere una acción selectiva sobre las neuronas colinérgicas en los cuernos ventrales de la médula espinal. La diferencia observada entre la muerte celular selectiva inducida por el cadmio sobre las neuronas colinérgicas a nivel del sistema nervioso periférico con la muerte más pronunciada pero no selectiva sobre las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal puede estar relacionada con diferencias en la distribución y acumulación del cadmio en distintas regiones, de igual manera que se observan estas diferencias dentro de la médula espinal. Por otro lado, en el cultivo de neuronas colinérgicas SN56 observamos una reducción concentración-dependiente de la viabilidad celular basada en los ensayos del MTT, activación de las caspasas 3/7 y liberación de LDH, mostrando una disminución significativa en la viabilidad celular desde la dosis de 1 μ M en el ensayo de MTT y de activación de las caspasas 3/7, pero un aumento significativo en la liberación de LDH desde la dosis de 10 μ M.

Esta diferencia podría estar relacionada con un cambio en el tipo de muerte celular desde la apoptosis a la necrosis como se ha descrito anteriormente (López et al., 2003).

Además, observamos en el cultivo de neuronas SN56 una disminución concentración-dependiente en los niveles de ACh correlacionada con la reducción de la viabilidad celular que podría explicar esta disminución. El cadmio aumentó la actividad de la AChE a concentraciones inferiores a 100 μM , pero disminuyó la actividad de la AChE a dosis superiores a 1000 μM , lo cual está de acuerdo con lo descrito en estudios anteriores (Carageorgiou et al., 2004; Gkanti et al., 2014; Zarros et al., 2013). La disminución en la actividad de la AChE no puede explicar la reducción concentración-dependiente de la ACh, lo cual se explica por la reducción concentración-dependiente de la actividad de la ChAT, dando lugar a una disminución de la producción de ACh. Los resultados sobre las actividades enzimáticas comentados podrían estar relacionados con la muerte celular, pero como los resultados fueron normalizados con las concentraciones de proteínas, este factor de confusión fue eliminado, lo que sugiere que el efecto observado podría estar relacionado con una acción directa del cadmio sobre ellas.

Anteriormente, se ha descrito que la ACh desempeña un papel en la supervivencia celular a través de la activación del receptor colinérgico (Resende y Adhikari, 2009), y una reducción en sus niveles podría aumentar la muerte celular, siendo éste un posible mecanismo que medie la muerte celular más pronunciada observada en las neuronas colinérgicas. Sin embargo, la co-incubación de la ACh con cadmio no fue capaz de reducir la muerte celular inducida por el cadmio, lo que sugiere que otros mecanismos deben de estar implicados. En este sentido, se ha descrito que el tratamiento con cadmio tanto *in vivo* como *in vitro* (50-100 μM) bloquea los receptores muscarínicos en el cerebro de la rata, alcanzando esta inhibición el 50% de los receptores muscarínicos (Hedlund et al., 1979; Hedlund y Bartfai, 1979) y se ha

descrito que disminuye tanto la respuesta máxima a la ACh (10 μ M) como a la pirenzepina, antagonista selectivo de RM1, en los anillos aórticos de ratas macho, sugiriendo que podría bloquear selectivamente los RM1 (Ghelardini et al., 1999). En el presente estudio mostramos que el cadmio bloqueó los receptores RM1 en el rango de las concentraciones previamente descrito, lo cual respalda nuestros resultados y podría explicar por qué la co-administración de ACh con cadmio no revirtió los efectos observados sobre la viabilidad de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. Además, el silenciamiento del RM1 en el cultivo primario de neuronas del prosencéfalo basal indujo muerte celular sobre las neuronas de esta región siendo más pronunciada sobre las neuronas colinérgicas, de igual manera que el efecto producido por el tratamiento solo con cadmio. Sin embargo, el nivel de reducción de la viabilidad celular tras el silenciamiento de RM1 en las células del prosencéfalo basal fue menor que tras el tratamiento con cadmio de células silenciadas para RM1, sugiriendo que otros mecanismos están involucrados. En este sentido el silenciamiento de RM1 en neuronas colinérgicas SN56 indujo la pérdida de neuronas, pero la muerte celular inducida fue en un nivel inferior al producido por el tratamiento con cadmio de células silenciadas para M1R o tras el tratamiento con cadmio a mayores concentraciones de las células no silenciadas. Estos resultados muestran que el bloqueo del RM1 por el cadmio contribuye significativamente a la muerte celular más pronunciada de las neuronas colinérgicas, pero sugieren que otros mecanismos están implicados en este efecto.

Además, se ha descrito que el cadmio aumenta la producción de proteína A β (Smedman et al., 1997) y la formación de filamentos Tau (Jiang et al., 2007), mecanismos que se han relacionado con la inducción de la muerte celular en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Kar et al., 2004), siendo también capaz de mediar este efecto. En este sentido, el tratamiento con cadmio de neuronas colinérgicas SN56

también aumentó los niveles de A β 1-40 y A β 1-42, con un mayor incremento en los niveles de A β 1-42, que se ha descrito que es más fibrillogénico y muestra una mayor neurotoxicidad *in vivo* que el péptido A β 1-40 (Klein et al., 1999). Estos resultados están de acuerdo con los datos previamente descritos (Li et al., 2012; Smedman et al., 1997). El tratamiento con cadmio de las células SN56 silenciadas para β APP atenuó la activación de las caspasas 3/7, la liberación de LDH y la reducción de la viabilidad celular observada tras el tratamiento sólo con cadmio, lo que demuestra que las proteínas A β median la muerte celular inducida por el cadmio sobre las neuronas colinérgicas. Por otra parte, el tratamiento con cadmio de neuronas SN56 también aumentó los niveles de proteínas Tau totales y fosforiladas y aumentó la expresión de la enzima GSK-3 β , lo que está en concordancia con estudios previos (Wang et al., 2009). Sin embargo, el tratamiento con cadmio de las células SN56 silenciadas contra GSK-3 β redujo los niveles de las proteínas Tau totales y fosforiladas, la activación de las caspasas 3/7, la liberación de LDH y la inducción de muerte celular observada tras el tratamiento sólo con cadmio, lo que evidenció la implicación de las proteínas Tau en la muerte de neuronas colinérgicas septales. En este sentido, se ha descrito que la acumulación de proteínas Tau o la hiperfosforilación de las mismas, principalmente a través de la inducción de GSK-3 β , induce la muerte celular neuronal (Avila et al., 2004; Beharry et al., 2014), lo cual apoya nuestros resultados.

También observamos que la expresión de la AChE se incrementó de una manera concentración-dependiente en las neuronas SN56 tratadas con cadmio, correlacionándose con la reducción de la viabilidad celular y el silenciamiento de su expresión revirtió parcialmente esta reducción, sugiriendo que el silenciamiento de la AChE podría estar implicado en la muerte celular más pronunciada observada en las neuronas colinérgicas. Además, observamos que el tratamiento con cadmio aumentó la expresión de la variante AChE-S y disminuyó la expresión de la variante AChE-R. La disminución de la expresión de AChE-R junto con la sobreexpresión

de la variante AChE-S se ha asociado con neurodegeneración y muerte celular (Birikh et al., 2003; Greenberg et al., 2010; Zimmermann, 2013). Por lo tanto, este mecanismo también podría explicar la muerte celular más pronunciada observada sobre las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. Por otra parte, el silenciamiento simultáneo de RM1, AChE, β APP y GSK-3 β produjo una reversión parcial de la muerte celular observada solo con el silenciamiento de RM1. Además, el tratamiento con cadmio de células SN56 silenciadas simultáneamente para AChE, RM1, β APP y GSK-3 β redujo el aumento de la muerte celular producido por el tratamiento sólo con cadmio. Estos datos sugieren que otros mecanismos además de los descritos arriba están implicados en la muerte celular inducida sobre neuronas colinérgicas septales.

Por otra parte, se ha descrito que la estimulación de los receptores muscarínicos M1 con agonistas selectivos da como resultado la inhibición de la enzima GSK-3 β (Fisher 2012; Lahmy et al., 2013), el procesamiento de la proteína β APP a productos no amiloidogénicos, la disminución de fosforilación de proteínas Tau y la reversión de los deterioros cognitivos en ratones transgénicos (Graham et al., 2013; Pavia et al., 1998). Por el contrario, la delección de RM1 conduce a un aumento en la generación de A β y la formación de placas amiloideas en un modelo de ratón de EA (Davis et al., 2010), a la reducción de la actividad de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) (Park et al., 2004) y a la inducción de patología Tau (Fisher, 2012). Por otra parte, el bloqueo de los RM1 resulta en el deterioro de la memoria en ratas y en el hombre, que imita el déficit de memoria inducido en la EA (Anagnostaras et al., 2003; Atri et al., 2004). Además, se ha demostrado que el RM1 presenta un papel esencial para la expresión de las variantes de la AChE observado con el tratamiento con antagonistas de los receptores M1, que disminuyen la expresión de la AChE (Salmon et al., 2005). Por lo tanto, los efectos observados en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal podrían estar mediados por el

bloqueo de los RM1 por el cadmio. En este sentido, nuestros resultados muestran que el silenciamiento de RM1 en las células SN56 aumentó la expresión de la AChE-S y la GSK-3 β , los niveles de proteínas A β , Tau totales y fosforiladas, y disminuyó la expresión de AChE-R y la actividad de la ChAT, lo cual confirma que el cadmio media estos efectos a través del bloqueo del receptor muscarínico. Sin embargo, los efectos del silenciamiento de RM1 sobre estos mecanismos fueron menos pronunciados que los observados tras el tratamiento con cadmio de células silenciadas para RM1, lo que sugiere que el bloqueo de RM1 medió parcialmente estos mecanismos. Por otra parte, en comparación con el silenciamiento solo de RM1, el tratamiento con cadmio de células silenciadas para RM1 produjo un mayor aumento en la expresión génica de AChE-S y GSK-3 β , los niveles de proteínas A β , Tau totales y fosforiladas, y también una mayor disminución de la expresión de AChE-R y la actividad de la ChAT. Esto sugiere que el bloqueo de RM1 por el cadmio puede mediar parcialmente estos mecanismos, pero que otros mecanismos pueden estar involucrados.

En estudios previos, se ha descrito que la AChE-S facilita la formación de placa A β en la EA, pero la AChE-R la inhibe. Los péptidos neurotóxicos amiloideos A β 1-40 y A β 1-42 son formados en función de la expresión de las dos variantes (Berson et al., 2008; Berson y Soreqn, 2010). Además, la sobreexpresión de la variante AChE-S se ha mostrado que induce la reducción de la actividad de la ChAT (Li et al., 2013) y una correlación positiva con la hiperfosforilación de Tau (Toiber et al., 2008) y causa la muerte celular en cultivos cerebrales primarios activando la vía apoptótica mediante la activación de GSK-3 β , Bax y las caspasas (Toiber et al., 2009). Según estos datos, la sobreexpresión de AChE-S y la represión de AChE-R inducida por el cadmio a través del bloqueo de los RM1, podrían mediar en parte los mecanismos implicados en la muerte de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. En este sentido, el tratamiento con cadmio de células silenciadas para AChE redujo el aumento

producido en la expresión génica de GSK-3 β , los niveles de proteínas A β , Tau totales y fosforiladas, y la disminución en la actividad de la ChAT tras el tratamiento solo con cadmio, lo que sugiere que todos estos efectos también están parcialmente mediados por la AChE. Además, el silenciamiento simultáneo de AChE y RM1 atenuó parcialmente el aumento de la expresión de GSK-3 β , los niveles de proteínas A β , Tau totales y fosforiladas, y la disminución de la actividad de la ChAT observado tras el silenciamiento único de RM1. Estos datos sugieren que M1R induce sus efectos a través de la alteración de la expresión de la AChE, pero que otros mecanismos pueden estar involucrados. El tratamiento con cadmio de células silenciadas simultáneamente para AChE y RM1 atenuó aún más el aumento de GSK-3 β , los niveles de proteínas A β , Tau totales y fosforiladas, y la disminución de la actividad de la ChAT observada tras el tratamiento con cadmio de células silenciadas para AChE, aunque esta atenuación no fue completa. De acuerdo con todo lo anterior, el cadmio media parcialmente sus efectos a través de M1R, al alterar la expresión de AChE, pero otros mecanismos pueden estar involucrados.

También se ha descrito que el cadmio induce especies reactivas del oxígeno (Luchese et al., 2007, Pari y Murugavel, 2007), la cuales se ha mostrado que inducen la muerte celular (Chandra et al., 2000) y, por tanto, también podrían mediar este efecto. En este sentido, el tratamiento con cadmio de las células SN56 indujo la generación de ERO y de peroxidación lipídica. El co-tratamiento con cadmio y antioxidante de las células SN56 revirtió parcialmente la muerte celular inducida por el cadmio, lo cual sugiere que la generación de ERO participa en la inducción de muerte celular. Por otra parte, se ha descrito que las ERO producen daños sobre las proteínas y los lípidos, y en particular se ha descrito que la exposición a radicales libre reduce la actividad de los receptores colinérgicos. Este efecto puede ser debido a que residuos críticos de los receptores sean dañados o escondidos por la acción oxidativa de las ERO (Fawcett et al., 2002). Por lo tanto, la inducción de estrés oxidativos podría mediar el bloqueo

observado del RM1 inducido por el cadmio. En este sentido, el tratamiento de células con antioxidante NAC revirtió parcialmente el bloqueo inducido por el cadmio sobre el RM1, lo que indica que la generación de ERO media en parte de forma indirecta el bloqueo inducido por el cadmio del RM1. Nuestros resultados son respaldados por un estudio previo que demostró como el tratamiento con el antioxidante quercetina redujo el bloqueo del cadmio sobre el RM1 (Gupta et al., 2016).

Además, la generación de ERO se ha relacionado con la alteración de la expresión de las variantes de la AChE y de la GSK-3 β , la producción de proteínas A β , Tau totales y Tau fosforiladas (Bond et al., 2006; Giraldo et al., 2014; Rojo et al., 2008; Tamagno et al., 2005; Wang et al., 2009). En este sentido, el co-tratamiento con cadmio y NAC del cultivo de células SN56 revertió parcialmente el aumento de la expresión de la AChE-S, de la GSK-3 β , de los niveles de proteínas A β , Tau totales y fosforiladas, y la disminución de la actividad de la ChAT y de la expresión de la AChE-R observadas tras el tratamiento sólo con cadmio. Además, la reversión sobre la sobreexpresión de la AChE-S y la represión de la AChE-R fue menor cuando el co-tratamiento con cadmio y antioxidante se realizó sobre células silenciadas para el RM1, lo cual indica que el bloqueo junto a la generación de ERO median en parte la alteración de la expresión de las variantes de la AChE. Estos datos sugieren que el cadmio induce sus efectos a través de la generación de ERO, que a su vez induce sus efectos en parte por el bloqueo de los RM1 a través de la alteración de la expresión de la AChE, pero otros mecanismos pueden estar involucrados.

A este respecto, se ha descrito que también son necesarios otros receptores muscarínicos para promover la supervivencia celular (Budd et al., 2003, 2004, De Sarno et al., 2003; Lindenboim et al., 1995). El cadmio también podría bloquear estos subtipos de receptores

muscarínicos o disminuir su activación debido a su capacidad para alterar la transmisión colinérgica (Dwivedi, 1983), mediando así el efecto observado en las neuronas colinérgicas. Además, las proteínas Tau presentan la capacidad de unirse y activar los receptores muscarínicos M1 y M3 (RM3) cuya activación prolongada induce la muerte celular (Díaz-Hernández et al., 2010; Gómez-Ramos et al., 2008). Por lo tanto, el aumento de las proteínas Tau inducida por el bloqueo de RM1 por el cadmio podría inducir la muerte celular en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal a través de la sobreactivación del RM3. En este sentido, la estimulación del receptor muscarínico M3 se ha relacionado con una reducción en la formación de proteínas A β (Nitsch et al., 1992), y su bloqueo podría mediar el efecto observado tras el tratamiento con cadmio (Li et al., 2012), pudiendo ser éste otro posible mecanismo que explicara estos efectos.

En función de todos lo expuesto, se puede concluir que el cadmio induce una alteración de la transmisión colinérgica y una muerte celular más pronunciada pero no selectiva sobre las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, mediada en parte por la inducción de ERO y el bloqueo de los receptores M1 muscarínicos. El bloqueo de los receptores muscarínicos por el cadmio está mediado en parte por la generación de ERO. Por otra parte, estas dos acciones inducen en parte la alteración de las variantes de la AChE, las cuales inducen la sobreexpresión de GSK-3 β y un aumento en las proteínas A β , Tau totales y fosforiladas que dan lugar a la muerte neuronal. Las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, que se proyectan al hipocampo y al neocórtex, son las más gravemente afectadas en la EA. Se ha sugerido que la alteración de la transmisión colinérgica y la pérdida de las inervaciones colinérgicas corticales e hipocámpales del prosencéfalo basal contribuyen a los déficits cognitivos progresivos observados en pacientes con EA (Auld et al., 2002; Kar et al., 2004; Kesner et al., 1989; Madziar et al., 2005; Schliebs, 2005). Por lo tanto, los efectos observados sobre las neuronas colinérgicas

del prosencéfalo basal pueden ser, en parte, responsables de los déficits de aprendizaje observados en la toxicidad del cadmio. Por otra parte, aunque se han encontrado niveles más altos de cadmio en los tejidos cerebrales de los pacientes con EA que en personas sanas y se ha relacionado como un posible factor de riesgo para la EA, todavía no se ha demostrado su implicación. Nuestros resultados podrían apoyar su posible implicación porque el cadmio alteró los principales marcadores de la EA. Sin embargo, también podrían sugerir que la toxicidad de cadmio puede compartir algunos mecanismos con la EA que inducen los síntomas que comparten. Se deben desarrollar posteriores estudios con el objetivo de determinar el resto de mecanismos involucrados en la muerte celular más pronunciada observada en las neuronas colinérgicas y también los mecanismos completos por los que la generación de ERO y el bloqueo de RM1 median este efecto, así como para corroborar *in vivo* que este efecto media los trastornos cognitivos observados tras la exposición al cadmio. Estos resultados son de gran interés porque podrían conducir a una mejor comprensión de los mecanismos responsables de producir las alteraciones cognitivas inducidas por el cadmio.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Primera: Los resultados de nuestra investigación demuestran que el cadmio induce, tras 24 horas de exposición, muerte celular, concentración-dependiente, sobre las neuronas del prosencéfalo basal, siendo ésta más pronunciada sobre las neuronas colinérgicas. Este efecto fue mediado en parte a través del bloqueo de los receptores muscarínicos M1.

Segunda: El cadmio induce muerte celular, concentración-dependiente, por apoptosis y necrosis tras 24 horas de exposición (desde 1 μ M y 10 μ M respectivamente) en las neuronas colinérgicas SN56 del prosencéfalo basal.

Tercera: El cadmio produce una disminución de los niveles de ACh tras 24 horas de exposición (desde 1 μ M) mediado por la reducción de la actividad de la ChAT.

Cuarta: El cadmio induce, tras 24 horas de exposición (desde 1 μ M), la generación de ERO y peroxidación lipídica, concentración-dependiente, en las neuronas colinérgicas SN56 del prosencéfalo basal.

Quinta: El cadmio induce, tras 24 horas de exposición (desde 1 μ M), el bloqueo de los receptores muscarínicos M1, la sobreexpresión de AChE-S y de GSK-3 β , el incremento en la formación de proteínas A β , Tau totales y fosforiladas y la reducción en la expresión de la

AChE-R y de la actividad de la ChAT, concentración-dependiente, en las neuronas colinérgicas SN56 del prosencéfalo basal.

Sexta: Las ERO generadas por el cadmio median de forma parcial el bloqueo de los receptores muscarínicos M1, la sobreexpresión de AChE-S y de GSK-3 β , en incremento en la formación de proteínas A β , Tau totales y fosforiladas y la reducción en la expresión de la AChE-R y de la actividad de la ChAT en las neuronas colinérgicas SN56 del prosencéfalo basal.

Séptima: El bloqueo de los receptores muscarínicos M1 induce de forma parcial la sobreexpresión de AChE-S y de GSK-3 β , en incremento en la formación de proteínas A β , Tau totales y fosforiladas y la reducción en la expresión de la AChE-R y de la actividad de la ChAT en las neuronas colinérgicas SN56 del prosencéfalo basal.

Octava: La sobreexpresión de AChE media la inducción de la GSK-3 β y el incremento en la formación de proteínas A β , Tau totales y fosforiladas y de la reducción de la actividad de la ChAT en las neuronas colinérgicas SN56 del prosencéfalo basal.

Novena: El cadmio induce la muerte celular mediada parcialmente por medio de la generación de estrés oxidativo, la sobreexpresión de AChE-S y de GSK-3 β , el incremento en la formación de proteínas A β , Tau totales y fosforiladas y la reducción en la expresión de la AChE-R.

Décima: La alteración de la transmisión colinérgica no tuvo efecto sobre la inducción de muerte neuronal. El cadmio induce este efecto a través de la inducción de estrés oxidativo y bloqueo de los receptores muscarínicos M1, que a su vez inducen el resto de mecanismos que dan lugar a la muerte celular a través de la alteración de las variantes de la AChE.

Undécima: Se requieren estudios posteriores para determinar el resto de mecanismos implicados en estos efectos observados en las neuronas colinérgicas y para confirmar la implicación de estos efectos sobre las alteraciones cognitivas *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Achanzar WE, Webber MM, Waalkes MP. (2002). Altered apoptotic gene expression and acquired apoptotic resistance in cadmium-transformed human prostate epithelial cell. *Prostate*. 52, pp. 236–244.
- Addison WN, Azari F, Sørensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. (2007). Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Bio Chem*. 282, pp. 15872–15883.
- Adimoolam S, Ford JM. (2002). p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99, pp.12985–12990.
- Aioli P, Carmignani M, Volpe AR, Di Benedetto Claudio L, Waalkes MP, Bokhoven A, Tokar EJ, Claudio PC. (2012). Cadmium induces p53-dependent apoptosis in human prostate epithelial cells. *PLoS ONE*. 7 pp. e33647.
- Alberts P, Ogren V, Sellstrom A. (1985). Cadmium inhibition of [3H] acetylcholine secretion in guinea-pig ileum myenteric plexus. *Acta. Physiol. Scand*. 124, pp. 313–316.
- Alfvén T, Elinder CG, Carlsson MD, Grubb A, Hellström L, Persson B, Pettersson C, Spång G, Schütz A, Järup L. (2000). Low-level cadmium exposure and osteoporosis. *J. Bone. Miner. Res*. 15, pp. 1579–1586.
- Alloway BJ, Steines E. (1999). Anthropogenic additions of cadmium to soils. En: *Cadmium in soils and plants*. (p. 97-123). Ed. McLaughlin MJ, Singh BR. Kluwer Academic Publishers.
- Anagnostaras SG, Murphy GG, Hamilton SE, Mitchell SL, Rahnema NP, Nathanson NM, Silva AJ. (2003). Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nat. Neurosci*. 6, pp. 51–58.
- Andersen O, Nielsen JB, Sorensen JA, Scherrebeck L. (1994). Experimental Localization of Intestinal Uptake Sites for Metals (Cd, Hg, Zn, Se) In Vivo in Mice. *Environ. Health. Perspect*. 102(Suppl 3), pp. 199-206.
- Andersson H, Petersson-Grawe K, Lindqvist E, Luthman J, Oskarsson A, Olson L. (1997). Low-level cadmium exposure of lactating rats causes alterations in brain serotonin levels in the offspring. *Neurotoxicol. Teratol*. 19(2), pp.105–115.
- Anetor JI. (2012). Rising environmental cadmium levels in developing countries: threat to genome stability and health. *J. Environ. Anal. Toxicol*. 2, pp. 140.
- Antonio MT, Corredor L, Leret ML. (2003). Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. *Toxicol Lett*. 143, pp. 331-340.
- Arnich N, Cunat L, Lanhers MC, Burnel D. (2004). Comparative in situ study of the intestinal absorption of aluminium, manganese, nickel, and lead in rats. *Biol. Trace. Element. Research*. 99, pp.157-172.
- Arroyo VS, Flores KM, Ortiz LB, Gómez-Quiroz LE, Gutiérrez-Ruiz MC. (2012). Liver and cadmium toxicity. *J. Drug. Metab. Toxicol*. S5, pp. 001.
- Aschner M, Cherian GM, Klaassen DC, Palmitier DR, Erickson CJ, Bush IA. (1997). Metallothioneins in brain-the role in physiology and pathology. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 142, pp. 229–242.
- Atri A, Sherman S, Norman KA, Kirchhoff BA, Nicolas MM, Greicius MD, Cramer SC, Breiter, HC, Hasselmo ME, Stern CE. (2004). Blockade of central cholinergic receptors impairs new learning and increases proactive interference in a word paired-associate memory task. *Behav. Neurosci*. 118, pp. 223–236.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2012). Toxicological Profile for Cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA.

- Auermann E, Dassler HG, Cumbrowski J, Kneuer M, Jacobi J, Kuhn H. (1979). Cadmium content of vegetable foods in the effective range of a lead smelting plant. *Nahrung*. 23, pp. 875–890.
- Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. (2002). Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog. Neurobiol.* 68, pp. 209–245.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. (2004) Role of Tau protein b-amyloid and Tau protein levels. *Arch. Toxicol.* 90, pp. 1081–1092.
- Barbee JYJ, Prince TS. (1999). Acute respiratory distress syndrome in a welder exposed to metal fumes. *South Med J.* 92, pp. 510–512.
- Barrett HM, Irwin DA, Semmons E. (1947). Studies on the toxicity of inhaled cadmium. I. The acute toxicity of cadmium oxide by inhalation. *J Ind Hyg Toxicol.* 29, pp. 279–285.
- Bayazit Y, Ertug PU, Urunsak M, Gocmen C, Aridogan IA, Turunc T, Singirik E. (2002). Effects of chronic cadmium exposure on contractility of the rat detrusor. *Urol. Res.* 30, pp. 21–25.
- Beharry C, Cohen LS, Di J, Ibrahim K, Briffa-Mirabella SA, Adel C. (2014). Tau-induced neurodegeneration: mechanisms and targets. *Neurosci. Bull.* 30(2), pp. 346–358.
- Benoff S, Hauser R, Marmar J, Hurley I, Napolitano B, Centola G. (2009). Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: correlations with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial insemination donors, and unselected volunteers). *Mol Med.* 15, pp. 248–262.
- Berson A, Knobloch M, Hanan M, Kirchhoff BA, Nicolas MM, Greicius MD, Cramer SC, Breiter HC, Hasselmo ME, Stern CE. (2008). Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology. *Brain.* 131(Pt 1), pp.109–119.
- Berson A, Soreq H. (2010). It all starts at the ends: multifaceted involvement of C -and N-terminally modified cholinesterases in Alzheimer's disease. *Rambam. Maimonides. Med. J.* 1, pp. e0014.
- Berson A, Knobloch M, Hanan M, Diamant S, Sharoni M, Schuppli D, Geyer BC, Ravid R, Mor, TS, Nitsch RM, Soreq H. (2008). Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology. *Brain.* 131, pp.109–119.
- Bertin G, Averbeck D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie.* 88, pp.1549–1559.
- Betz AL, Goldestein GW, (1986). Specialized properties and solute transport in brain capillaries. *Annu. Rev. Physiol.* 48, pp. 241–250.
- Beyersmann D, Hechtenberg S. (1997). Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144, pp.247–261.
- Bhat RV, Budd Haerberlein SL, Avila J. (2004). Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J. Neurochem.* 89, pp. 1313–1317.
- Bhattacharyya MH. (2009). Cadmium osteotoxicity in experimental animals: mechanisms and relationship to human exposures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, pp. 258–265.
- Bierer LM, Haroutunian V, Gabriel S, Knott PJ, Carlin LS, Purohit DP, Perl DP, Schmeidler J, Kanof P, Davis KL. (1995). Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J. Neurochem.* 64(2), pp.749–760.
- Bielarczyk H, Tomaszewicz M, Madziar B, Cwikowska J, Pawelczyk T, Szutowicz A. (2003). Relationships between cholinergic phenotype and acetyl-CoA level in hybrid murine neuroblastoma cells of septal origin. *J. Neurosci. Res.* 73(5), pp. 717–721.
- Bilgen I, Oner G, Edremitlioglu M, Alkan Z, Cirrik S. (2003). Involvement of cholinceptors in cadmium-induced endothelial dysfunction. *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* 14(1), pp.55–76.

- Birikh KR, Sklan EH, Shoham S, Soreq H. (2003). Interaction of “readthrough” acetylcholinesterase with RACK1 and PKC β II correlates with intensified fear-induced conflict behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100(1), pp. 283–288.
- Bodo M, Balloni S, Lumare E, Bacci M, Calvitti M, Dell’Omo M, Murgia N, Marinucci L. (2010). Effects of sub-toxic Cadmium concentrations on bone gene expression program: results of an in vitro study. *Toxicol. In Vitro*. 6, pp.1670–1680.
- Bond CE, Patel P, Crouch L, Tetlow N, Day T, Abu-Hayyeh S, Williamson C, Greenfield SA. (2006). Astroglia up-regulate transcription and secretion of ‘readthrough’ acetylcholinesterase following oxidative stress. *Eur. J. Neurosci*. 24(2), pp. 381–386.
- Bravard A, Campalans A, Vacher M, Gouget B, Levalois C, Chevillard S, Radicella JP. (2009). Inactivation by oxidation and recruitment into stress granules of hOGG1 but not APE1 in human cells exposed to sub-lethal concentrations of cadmium. *Mutat. Res*. 685, pp.61–69.
- Bridges CC, Zalups RK. (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 204, pp. 274–308.
- Bruscalupi G, Massimi M, Devirgiliis LC, Leoni S. (2009). Multiple parameters are involved in the effects of cadmium on prenatal hepatocytes. *Toxicol. In Vitro*. 23, pp. 1311–1318.
- Budavari S, O’Neil MJ, Smith A, Heckelman PE. (1989). The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals Rahway, NJ: Merck and Company Inc.
- Budd DC, McDonald J, Emsley N, Cain K, Tobin AB. (2003). The C-terminal tail of the M3-muscarinic receptor possesses antiapoptotic properties. *J. Biol. Chem*. 278(21), pp. 19565–19573.
- Budd DC, Spragg EJ, Ridd K, Tobin AB. (2004). Signalling of the M3-muscarinic receptor to the anti-apoptotic pathway. *Biochem J*. 381(Pt 1), pp. 43–49.
- Bulmer FMR, Rothwel HE, Frankish ER. (1938). Industrial cadmium poisoning. *Can. Publ. Health. J*. 29, pp. 19–26.
- Buznikov GA, Shmukler YB, Lauder JM. (1996). From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? *Cell. Mol. Neurobiol*. 16(5), pp. 537–559.
- Campanari ML, Garcia-Ayllon MS, Belbin O, Galceran J, Lleo A, Saez-Valero J. (2014). Acetylcholinesterase modulates presenilin-1 levels and gamma-secretase activity. *J. Alzheimer’s Dis*. 41(3), pp. 911–924.
- Candéias S, Pons B, Viau M, Caillat S, Sauvaigo S. (2010). Direct inhibition of excision/synthesis DNA repair activities by cadmium: analysis on dedicated biochips. *Mutat. Res*. 694, pp. 53–59.
- Cannon VT, Zalups RK, Barfuss DW. (2001). Amino acid transporters involved in luminal transport of mercury conjugates of cysteine in rabbit proximal tubule. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*. 298, pp. :780–789.
- Carageorgiou, H., Tzotzes, V., Pantos, C., Mourouzis, C., Zarros, A., Tsakiris, S., (2004). In vivo and in vitro effects of cadmium on adult rat brain total antioxidant status, acetylcholinesterase, (Na⁺, K⁺)-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities: protection by L-cysteine. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol*. 94, pp.112–118.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free. Radic. Biol. Med*. 29, pp. 323–333.
- Chedrese PJ, Piasek M, Henson MC. (2006). Cadmium as an endocrine disruptor in the reproductive system. *Immunol. Endocr. Metab. Agents. Med. Chem*. 6, pp.27–35.
- Chen L, Liu L, Huang S. (2008). Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5. *Free. Radic. Biol. Med*. 45, pp. 1035–1044.
- Cherian MG, Goyer RA, Delaquerriere RL. (1976). Cadmium-metallothionein induced nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 38 pp. 399–408.
- Chertok RJ, Sasser LB, Callaham MF, Jarboe GE. (1981). Influence of cadmium on the intestinal uptake and absorption of calcium in the rat. *J. Nutr*. 111, pp. 631–638.

- Chia SE, Xu B, Ong CN, Tsakok FM, Lee ST. (1994). Effect of cadmium and cigarette smoking on human semen quality. *Int. J. Fertil. Menopausal. Stud.* 39, pp. 292–298.
- Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. (2015). Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9, pp. 124.
- Coonse KG, Coonts AJ, Morrison EV, Heggland SJ. (2007). Cadmium induces apoptosis in the osteoblast-like cell line, Saos-2. *J. Toxicol. Environ. Health. Part A.* 70, pp. 575–581.
- Cragg RA, Christie GR, Phillips SR, Russi RM, Küry S, Mathers JC, Taylor PM, Ford D. (2002). A novel zinc-regulated human zinc transport hZTLA, is localized to enterocyte apical membrane. *J. Biol. Chem.* 277, pp. 22789–22797.
- Czarnecki LA, Moberly AH, Rubinstein T, Turkel DJ, Pottackal J, McGann JP. (2011). “In vivo visualization of olfactory pathophysiology induced by intranasal cadmium instillation in mice. *NeuroToxicology.* 32(4), pp. 441–449.
- Dally H, Hartwig A. (1997). Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. *Carcinogenesis.* 18, pp. 1021–1026.
- DaRocha-Souto B, Coma M, Perez-Nievas BG, Scotton TC, Siao M, Sanchez-Ferrer P, Hashimoto T, Fan Z, Hudry E, Barroeta I, Sereno L, Rodriguez M, Sanchez MB, Hyman BT, Gomez-Isla T. (2012). Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates beta-amyloid induced neuritic damage in Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Dis.* 45, pp. 425–437.
- Davis AA, Fritz JJ, Wess J, Lah JJ, Levey AI. (2010). Deletion of M1 muscarinic acetylcholine receptors increases amyloid pathology in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* 30, pp. 4190–4196.
- De Sarno P, Shestopal SA, King TD, Zmijewska A, Song L, Jope RS. (2003). Muscarinic receptor activation protects cells from apoptotic effects of DNA damage, oxidative stress, and mitochondrial inhibition. *J. Biol. Chem.* 278, pp. 11086–11093.
- Del Raso NJ, Foy BD, Gearhart JM, Frazier JM. (2003). Cadmium uptake kinetics in rat hepatocytes: correlation for albumin binding. *Toxicol. Sci.* 72, pp. 19–30.
- Diario Oficial de la Unión Europea. (2011). Directiva 2011/65/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 8 de junio de 2011 sobre restricciones a la utilización de determinadas sustancias peligrosas en aparatos eléctricos y electrodomésticos. 01/07/2011, 174/88–110.
- Diaz-Hernández M, Gomez-Ramos A, Rubio A, Gomez-Villafuertes R, Naranjo JR, Miras-Portugal MT, Avila J. (2010). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular Tau. *J. Biol. Chem.* 285, pp. 32539–32548.
- Dori A, Cohen J, Silverman WF, Pollack Y, Soreq H. (2005) Functional manipulations of acetylcholinesterase splice variants highlight alternative splicing contributions to murine neocortical development. *Cereb. Cortex.* 15(4), pp. 419–430.
- Dorian C, Gattone IIVH, Klaassen CD. (1995). Discrepancy between the nephrotoxic potencies of cadmium-metallothionein and cadmium chloride and the renal concentration of cadmium in the proximal convoluted tubules. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 130, pp. 161–168.
- Dwivedi C. (1983). Cadmium-induced sterility: possible involvement of the cholinergic system. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12, pp. 151–156.
- Ebadi M, Iversen PL, Hao R, Ceruti DR, Rojas P, Happe HK, Murrin LC, Pfeiffer RF. (1995). Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem. Int.* 27, pp. 1–22.
- Ebadi M, Perini F, Mountjoy K, Garvey JS. (1996). Amino acid composition, immunoreactivity, sequence analysis, and function of bovine hippocampal metallothionein isoforms. *J. Neurochem.* 66(5), pp. 2121–2127.
- EFSA. (2009). *Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food. The EFSA Journal.* 980, pp. 1–139.
- Elinder CG, Lind B, Kjellstrom T, Linnman L, Friberg L. (1976). Cadmium in kidney cortex, liver, and pancreas from Swedish autopsies. Estimation of biological half time in kidney cortex, considering calorie intake and smoking habits. *Arch. Environ. Health.* 31, pp. 292–302.

- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Ston, RM. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, pp. 88–95.
- Endo T, Kimura O, Sakata M. (2002). Effects of P-glycoprotein inhibitors on cadmium accumulation in cultured renal epithelial cells, LLC-PK1, and OK. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185, pp. 166–171.
- Esquifino AI, Seara R, Fernández-Rey E, Lafuente A. (2001). Alternate cadmium exposure differentially affects the content of gamma aminobutyric acid (GABA) and Taurine within the hypothalamus, median eminence, striatum and prefrontal. *Arch. Toxicol.* 75, pp. 127–133.
- Evron T, Greenberg D, Mor TS, Soreq H. (2007). Adaptive changes exacerbate Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Am. J. Exp. Toxicol.* 15(5), pp. 400–405.
- Herlenius E, Lagercrantz H. (2001). Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. *Early. Hum. Dev.* 65(1), pp. 21–37.
- Fawcett JR, Bordayo EZ, Jackson K, Liu H, Peterson J, Svitak A, Frey WH. (2002). Inactivation of the human brain muscarinic acetylcholine receptor by oxidative damage catalyzed by a low molecular weight endogenous inhibitor from Alzheimer's brain is prevented by pyrophosphate analogs, bioflavonoids and other antioxidants. *Brain. Res.* 950(1-2), pp. 10–20.
- Falnoga I, Tusek-Znidaric, M., Horvat, M., Stegnar, P. (2000). Mercury, selenium, and cadmium in human autopsy samples from Idrija residents and mercury mine workers. *Environ. Res.* 84, pp. 211–218.
- Fatur T, Tusek M, Falnoga I, Scancar J, Lah TT, Filipic M. (2003). Cadmium inhibits repair of UV-, methyl methanesulfonate- and N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res.* 529, pp. 109–116.
- Fechner P, Damdimopoulou P, Gauglitz G. (2011). Biosensors paving the way to understanding the interaction between cadmium and the estrogenic receptor alpha. *PLoS ONE.* 6, PP. e23048.
- Figueiredo-Pereira, M.E., Yakushin, S., Cohen, G. (1998). Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 273(21), pp. 12703–12709.
- Fisher A. (2012). Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: perspectives and challenges in treatment of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 120 (Suppl 1), pp. 22–33.
- Flora SJS, Mittal M, Mehta A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian. J. Med. Res.* 128, pp. 501–523.
- Fonnum F. (1975). A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* 24, pp. 407–409.
- Ford BN, Ruttan CC, Kyle VL, Brackley ME, Glickman BW. (2000). Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis.* 21, pp. 1977–1981.
- Fowler BA, Nordberg GF. (1978). The renal toxicity of cadmium-metallothionein: morphometric and X-ray microanalytical studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 46, pp. 609–623.
- Friberg L, Kjellström T, Nordberg GF. (1986). Cadmium. EN: Friberg L, Nordberg GF, Vouk VB, Editores. *Handbook on the toxicology of metals.* New York: Elsevier, Vol. 2, pp. 130–184.
- Friberg L. (1950). Health hazards in the manufacture of alkaline accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning; a clinical and experimental study. *Acta. Med. Scand.* 240, pp. 1–124.
- Fujishiro H, Okugaki S, Kubota K, Fujiyama T, Miyataka H, Himeno S. (2009). The role of ZIP8 down-regulation in cadmium-resistant metallothionein-null cells. *J. Appl. Toxicol.* 29, pp. 367–373.
- Gensburger C, Labourdette G, Sensenbrenner M. (1986). Influence of meningeal cells on the proliferation and maturation of rat neuroblasts in culture. *Exp. Brain. Res.* 63, pp. 321–330.

- Ghelardini C, Galeotti N, Matucci R, Bellucci C, Gualtieri F, Capaccioli S, Quattrone A, Bartolini A. (1999). Antisense 'knockdowns' of M1 receptors induces transient anterograde amnesia in mice. *Neuropharmacology*. 38, pp. 339–348.
- Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S. (2006). DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 213, pp. 282–290.
- Giraldo E, Lloret A, Fuchsberger T, Vina J. (2014). Abeta and Tau toxicities in Alzheimer's are linked via oxidative stress-induced p38 activation: protective role of vitamin E. *Redox. Biol.* 2, pp. 873–877.
- Gkanti V, Stolakis V, Kalafatakis K, Liapi C, Zissis KM, Zarros A, Tsakiris S. (2014). Postnuclear supernatants of rat brain regions as substrates for the in vitro assessment of cadmium-induced neurotoxicity on acetylcholinesterase activity. *Biol. Trace. Elem. Res.* 158(1), pp. 87–89.
- Glaser T, Klöppel H, Hochrainer D. (1986). Bioavailability indicators of inhaled cadmium compounds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 11, pp. 261–271.
- Gobe G, y Crane D. (2010). Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. *Toxicol. Lett.* 198, pp. 49–55.
- Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, (2006). The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J. Occup. Med. Toxicol.* 1, pp.22.
- Gómez-Ramos A, Díaz-Hernández M, Rubio A, Miras-Portugal MT, Avila J. (2008). Extracellular Tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, pp. 673–681.
- Gonçalves JF, Fiorenza AM, Spanevello RM, Mazzanti CM, Bochi GV, Antes FG, Stefanello N, Rubin MA, Dressler VL, Morsch VM, Schetinger MR. (2010). N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. *Chem. Bio.l Interact.* 186(1), pp.53–+++++60.
- Govil PK, Sorille JE, Murthy MN, Sujutha D, Reddy GL, Rudolph-Lund K, Krishna AK, Rama Mohan K. (2008). Soil contamination of heavy metals in the Katedon Industrial Developmental area, Hyderabad, India. *Environ. Monit. Assess.* 140, pp. 313–323.
- Goyer RA CW. (2008). Toxic effects of metals. (p. 811-867). En: *The basic Science of poisons*. CD K, Editor. New york. McGraw-Hill.
- Goyer RA, Cherian MG, Delaquerriere-Richardson L. (1984). Correlation of parameters of cadmium exposure with onset of cadmium-induced nephropathy in rats. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 5, pp. 89–100.
- Goyer RA, Miller CR, Zhu SY, Victory W. (1989). Non-metallothionein-bound cadmium in the pathogenesis of cadmium nephrotoxicity in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 101, pp. 232–244.
- Graham ES, Woo KK, Aalderink M, Fry S, Greenwood JM, Glass M, Dragunow M. (2013). M1 muscarinic receptor activation mediates cell death in M1-HEK293 cells. *PLoS One.* 8, pp. e72011.
- Greenberg DS, Toiber D, Berson A, Soreq H. (2010). Acetylcholinesterase variants in Alzheimer's disease: from neuroprotection to programmed cell death. *Neurodegener. Dis.* 7(1–3), pp. 60–63.
- Grisaru D, Pick M, Perry C, Sklan EH, Almog R, Goldberg I, Naparstek E, Lessing JB, Soreq H, Deutsch V. (2006). Hydrolytic and nonenzymatic functions of acetylcholinesterase comodule hemopoietic stress responses. *J. Immunol.* 176(1), pp.27–35.
- Gupta R, Shukla RK, Chandravanshi LP, Srivastava P, Dhuriya YK, Shanker J, Singh MP, Pant AB, Khanna VK. (2017). Protective Role of Quercetin in Cadmium-Induced Cholinergic Dysfunctions in Rat Brain by Modulating Mitochondrial Integrity and MAP Kinase Signaling. *Mol. Neurobiol.* 54, pp. 4560-4583.

- Gutiérrez-Reyes EY, Albores A, Ríos C. (1998). Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone-induced metallothionein. *Toxicology*. 131(2-3), pp. 145-154.
- Hammond DN, Wainer BH; Tonsgard JH; Heller A. (1986). Neuronal properties of clonal hybrid cell lines derived from central cholinergic neurons. *Science*. 234, pp. 1237-40.
- Hammond DN, Lee HJ, Tonsgard JH, Wainer BH. (1990). Development and characterization of clonal cell lines derived from septal cholinergic neurons. *Brain. Res.* 512(2), pp. 190-200.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. 100(1), pp. 57-70.
- Hart BA, Potts RJ, Watkin RD. (2001). Cadmium adaptation in the lung- a double-edged sword? *Toxicology*. 160, pp. 65-70.
- Hart RP, Rose CS, Hamer RM. (1989) Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. *J. Clin. Experim. Neuropsych.* 11, pp. 933-943.
- Hartl R, Gleinich A, Zimmermann M. (2011). Dramatic increase in readthrough acetylcholinesterase in a cellular model of oxidative stress. *J. Neurochem.* 116, pp. 1088-1096.
- Hartmann M, Hartwig A. (1998). Disturbance of DNA damage recognition after UV irradiation by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. *Carcinogenesis*. 19, pp. 617-621.
- Hartwig A, Asmuß M, Blessing H, Hoffmann S, Jahnkem G, Khandelwal S, Pelzer A, Bürkle A. (2002). Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability. *Food. Chem. Toxicol.* 40, pp. 1179-1184.
- Hartwig A. (2010). Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights. *Biometals*. 23, pp. 951-960.
- Hawkes C, Jhamandas JH, Kar S. (2005). Selective loss of basal forebrain cholinergic neurons by 192 IgG-saporin is associated with decreased phosphorylation of Ser glycogen synthase kinase-3 β . *J. Neurochem.* 95(1), pp. 263-272.
- Hayashi H, Takayama K. (1978). Inhibitory effects of cadmium on the release of acetylcholine from cardiac nerve terminals. *Jpn. J. Physiol.* 28, pp. 333-345.
- He L, Wang B, Hay EB, Nebert DW. (2009). Discovery of ZIP transporters that participate in cadmium damage to testis and kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, pp. 250-257.
- Hedlund B, Bartfai T. (1979). The importance of thiol- and disulfide groups in agonist and antagonist binding to the muscarinic receptor. *Mol. Pharmacol.* 15(3), pp. 531-544.
- Hedlund B, Gamarra M, Bartfai T. (1979). Inhibition of striatal muscarinic receptors in vivo by cadmium. *Brain, Res.* 168, pp. 216-218.
- Hellström L, Elinder CG, Dahlberg B, Lundberg M, Järup L, Persson B, Axelson O. (2001). Cadmium exposure and end-stage renal disease. *Am. J. Kidney. Dis.* 38, pp. 1001-1008.
- Henderson RF, Rebar AH, Pickrell JA, Newton GJ. (1979). Early damage indicators in the lung. III. Biochemical and cytological response of the lung to inhaled metal salts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 50, pp. 123-136.
- Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasák M. (2001). Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain. Res. Bull.* 55, pp. 133-145.
- Hidalgo J, Borras M, Garvey JS, Armario A. (1990). Liver, brain and heart metallothionein induction by stress. *J. Neurochem.* 55, pp. 651-654.
- Hidalgo J, Carrasco J. (1998). Regulation of the synthesis of brain metallothioneins. *Neurotoxicology*. 19, pp. 661-666.
- Hideaki S, Yasutake A, Hirashima T, Takamure Y, Kitano T, Waalkes MP, Y. Imamura. (2008). Strain difference of cadmium accumulation by liver slices of inbred Wistar-Imamichi and Fischer 344 rats. *Toxicol. In Vitro*. 22, pp. 338-343.
- Hinkle PM, Kinsella PA, Osterhoudt KC. (1987). Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *J. Biol. Chem.* 262, pp. 16333-16337.

- Hogervorst J, Plusquin M, Vangronsveld J, Nawrot T, Cuypers A, Van Hecke E, Roels HA, Carleer R, Staessen JA. (2007). House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population. *Environ. Research*. 103, pp. 30-37.
- Hossain S, Liu HN, Nguyen M, Shore G, Almazan G. (2009). Cadmium exposure induces mitochondria-dependent apoptosis in oligodendrocytes. *Neurotoxicology*. 30(4), pp. 544-554.
- Hudgens ED, Ji L, Carpenter CD, Petersen SL. (2009). The gad2 promoter is a transcriptional target of estrogen receptor (ER) alpha and ER beta: a unifying hypothesis to explain diverse effects of estradiol. *J. Neurosci*. 29(27), pp. 8790-8797.
- IARC International Agency for Research on Cancer. (1993). Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. En: International agency for research on cancer monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC Scientific Publications. 58, pp. 119-237.
- IARC International Agency for Research on Cancer. (2014). IPCS. International program on chemical safety Environmental health criteria 134. Cadmium. WHO, Geneva.
- Iwata K, Saito H, Moriyama M, Nakano A. (1991). Association between renal tubular dysfunction and mortality among residents in a cadmium-polluted area, Nagasaki Tohouku. *J. Exp. Med*. 164, pp. 93-102.
- Iwata K, Saito H, Moriyama M, Nakano A. (1992). Follow up study of renal tubular dysfunction and mortality in residents of an area polluted with cadmium. *Br. J. Ind. Med*. 49, pp. 736-737.
- Järup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. (1998). Health effects of cadmium exposure A review of the literature and a risk estimate. *Scand. J. Work. Environ. Health*. 24(3) (Suppl 1), pp. 1-51.
- Jiang LF, Yao TM, Zhu ZL, Wang C, Ji LN. (2007). Impacts of Cd (II) on the conformation and self-aggregation of Alzheimer's Tau fragment corresponding to the third repeat of microtubule-binding domain. *Biochim. Biophys. Acta*. 11(21), pp. 24.
- Jin T, Lu J, Nordberg M. (1998). Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. *Neurotoxicology*. 19, pp. 529-535.
- Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, Al-Refai H, Taylor JA, Kunkel TA, Resnick MA, Gordenin DA. (2003). Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat. Genet*. 34, pp. 326-329.
- Joseph P. (2009). Mechanism of cadmium carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 238, pp. 272-279.
- Jurasovic J, Cvitkovic P, Pizent A, Colak B, Telisman S. (2004). Semen quality and reproductive endocrine function with regard to blood cadmium in Croatian male subjects. *Biometals*. 17, pp. 735-743.
- Järup L. (2002). Cadmium overload and toxicity. *Nephrol. Dial. Transplant*. 17, pp. 35-39.
- Kalariya NM, Wills NK, Ramana KV, Srivastava SK, van Kuijk FJGM. (2009). Cadmium-induced apoptotic death of human retinal pigment epithelial cells is mediated by MAPK pathway. *Exp. Eye. Res*. 89, pp. 494-502.
- Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, Mount HT. (2004). Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J. Psychiatr. Neurosci*. 29, pp. 427-441.
- Karnovsky MJ, Roots L. (1964). A direct-coloring thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem*. 12, pp. 219-221.
- Kesner RP, Adelstein TB, Crutcher KA. (1989). Equivalent spatial location memory deficits in rats with medial septum or hippocampal formation lesions and patients with dementia of the Alzheimer's type. *Brain. Cogn*. 9, pp. 289-300.
- Kille P, Hemmings A, Lunney EA. (1994). Memories of metallothionein. *Biochim. Biophys. Acta*. 1205(2), pp. 151-161.

- Kirschvink N, Martin N, Fievez L, Smith N, Marlin D, Gustin P. (2006). Airway inflammation in cadmium-exposed rats is associated with pulmonary oxidative stress and emphysema. *Free. Radic. Res.* 40, pp. 241–250.
- Kjellström T. (1992). Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium. *IARC. Sci. Publ.* 18, pp. 301–310.
- Klaassen CD, Liu J. (1997). Role of metallothionein in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Drug. Metab. Rev.* 29, pp. 79–102.
- Klaassen CD, Liu J, Diwan BA. (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, pp. 215–220.
- Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. (1999). Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, pp. 267–294.
- Klein AM, Kowall NW, Ferrante R. (1999). Neurotoxicity and oxidative damage of beta amyloid 1–42 versus beta amyloid 1–40 in the mouse cerebral cortex. *Ann. NY. Acad. Sci.* 893, pp. 314–320.
- Kondoh M, Araragi S, Sato K, Higashimoto M, Takiguchi M, Sato M. (2002). Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60 cells. *Toxicology.* 170, pp. 111–117.
- Lafuente A, Fenández-Rey E, Seara R, Pérez-Lorenzo M, Esquifino AI. (2001). Alternate cadmium exposure differentially effects amino acid metabolism within the hypothalamus, median eminence, striatum and prefrontal cortex of male rats. *Neurochem. Int.* 39, pp. 187–92.
- Lafuente A, González-Carracedo A, Romero A, Esquifino AI. (2003). Effect of cadmium on 24-h variations in hypothalamic dopamine and serotonin metabolism in adult male rats. *Exp. Brain. Res.* 149, pp. 200–208.
- Låg M, Refsnes M, Lilleaas EM, Holme JA, Becher R, Schwarze PE. (2005). Role of mitogen activated protein kinases and protein kinase C in cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lungcells. *Toxicology.* 211, pp. 253–264.
- Lahmy V, Meunier J, Malmstrom S, Naert G, Givalois L, Kim SH, Villard V, Vamvakides A, Maurice T. (2013). Blockade of Tau hyperphosphorylation and Aβ(1)(–)(4)(2) generation by the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX2-73, a mixed muscarinic and sigma(1) receptor agonist, in a nontransgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology.* 38(9), pp.1706–1723.
- Lampe BJ, Park SK, Robins T, Mukherjee B, Litonjua AA, Amarasiriwardena C, M. Weisskopf, D. Sparrow, H. Hu. (2008). Association between 24-hour urinary cadmium and pulmonary function among community-exposed men: the VA normative aging study. *Environ. Health. Perspect.* 116, pp. 1226–1230.
- Lakshmana MK1, Raju TR. (1994). Endosulfan induces small but significant changes in the levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the developing rat brain and deficits in the operant learning performance. *Toxicology.* 91(2), pp. 139–150.
- Lazarini CA, Florio JC, Lemonica IP, Bernardi MM. (2001). Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 23(6), pp. 665–673.
- Lauder JM. (1985). Roles for neurotransmitters in development: possible interaction with drugs during the fetal and neonatal periods. *Prog. Clin. Bio.l Res.* 163C, pp. 375–380.
- Levitt P, Eagleson KL, Chan AV, Ferri RT, Lillien L. (1997). Signaling pathways that regulate specification of neurons in developing cerebral cortex. *Dev. Neurosci.* 19(1), pp. 6–8.
- Li M, Kondo T, Zhao QL, Li F, Tanabe K, Arai Y, Zhou Z, Kasuya M. (2000). Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 Cells through Ca²⁺-calpain and caspase-mitochondria dependent pathways. *J. Bio. Chem.* 275, pp. 39702–39709.
- Li, G., Klein, J., Zimmermann, M. (2013). Pathophysiological amyloid concentrations induce sustained upregulation of readthrough acetylcholinesterase mediating anti-apoptotic effects. *Neuroscience*, 240, pp. 349–360.

- Li X, Lv Y, Yu S, Zhao H, Yao L. (2012). The effect of cadmium on Abeta levels in APP/PS1 transgenic mice. *Exp. Ther. Med.* 4(1), pp. 125–130.
- Lindenboim L, Pinkas-Kramarski R, Sokolovsky M, Stein R. (1995). Activation of muscarinic receptors inhibits apoptosis in PC12M1 cells. *J. Neurochem.* 64(6), pp. 2491–2499.
- Liu J, Liu Y, Habeebu SS, Klaassen CD. (1998). Susceptibility of MT-null mice to chronic CdCl₂ induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. *Toxicol. Sci.* 46, pp. 197–203.
- Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ. (2006). Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, pp. 13612–13617.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods.* 25, pp. 402–408.
- Lopez E, Arce C, Oset-Gasque MJ, Canadas S, Gonzalez MP. (2006). Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free. Radic. Biol. Med.* 40(6), pp. 940–951.
- Lopez E, Figueroa S, Oset-Gasque, MJ, Gonzalez MP. (2003). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. *Br. J. Pharmacol.* 138, pp. 901–911.
- Luchese C, Brandao R, de Oliveira R, Nogueira CW, Santos FW. (2007). Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. *Toxicol. Lett.* 173(3), pp. 181–190.
- Madziar B, Lopez-Coviella I, Zemelko V, Berse B. (2005). Regulation of cholinergic gene expression by nerve growth factor depends on the phosphatidylinositol- 30-kinase pathway. *J. Neurochem.* 92, pp. 767–779.
- Makuch R, Baratta J, Karaelias LD, Lauterborn JC, Gall CM, Yu J, Robertson RT. (2001). Arrival of afferents and the differentiation of target neurons: studies of developing cholinergic projections to the dentate gyrus. *Neuroscience.* 104, pp. 81–91.
- Manca D, Ricard AC, Trottier B, Chevalier G. (1991). Studies for lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology.* 67, pp. 303–323.
- Mantha M, Jumarie C. (2010). Cadmium-induced hormetic effect in differentiated Caco-2 cells: ERK and p38 activation without cell proliferation stimulation. *J. Cell. Physiol.* 224, pp. 250–261.
- Manton WI, Kirkpatrick JB, Cocinero JD. (1984). Does the choroid plexus really protect the brain from lead? *Lancet.* 2(8398), pp. 351.
- Maret W, Valle BL. (1998). Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, pp. 3478–3482.
- Martelli A, Rousset E, Dycke C, Bouron A, Moulis JM. (2006). Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie.* 88, pp. 1807–1814.
- Martin P, Boulukos KE, Poggi MC, Pognonec P. (2009). Long-term extracellular signal-related kinase activation following cadmium intoxication is negatively regulated by a protein kinase C-dependent pathway affecting cadmium transport. *FEBS. J.* 276, pp. 1667–1679.
- Martin P, Poggi MC, Chambard JC, Boulukos KE, Pognonec P. (2006). Low dose cadmium poisoning results in sustained ERK phosphorylation and caspase activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, pp. 803–807.
- Méndez-Armenta M., Barroso-Moguel R, Villeda-Hernández J, Nava-Ruiz C, Ríos C. (2001). Histopathological alterations in the brain regions of rats after perinatal combined treatment with cadmium and dexamethasone. *Toxicology.* 161, pp. 189–199.
- Mendez-Armenta M, Rios C. (2007). Cadmium neurotoxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, pp. 350–358.

- Mennicken F, Quirion R. (1997). Interleukin-2 increases choline acetyltransferase activity in septal-cell cultures. *Synapse*. 26, pp. 175–183.
- Meplan C, Richard MJ, Hainaut P. (1999). Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochem. Pharmacol.* 59, pp. 25–33.
- Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. (2002). Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*. 110, pp. 627–639.
- Miceli F, Minici F, Tropea A, Catino S, Orlando M, Lamanna G, Sagnella F, Tiberi F, Bompiani A, Mancuso S, Lanzzone A, Apa R. (2005). Effects of nicotine on human luteal cells in vitro: a possible role on reproductive outcome for smoking women. *Biol. Reprod.* 72, pp. 628–632.
- Moore W Jr, Stara JF, Crocker WC, Malanchuk M, Iltis R. (1973). Comparison of ¹¹⁵Cd retention in rats following different routes of administration. *Environ. Res.* 6, pp. 473–478.
- Morselt AFW. (1991). Environmental pollutants and diseases. A cell biological approach using chronic cadmium exposure in the animal model as a paradigm case. *Toxicology*. 70, pp.1–132.
- Moulis JM. (2010). Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biometals*. 23, pp. 877–896.
- Mousa SA. (2004). Expression of adhesion molecules during cadmium hepatotoxicity. *Life. Sci.* 75, pp. 93–105.
- Murakami M, Cain K, Webb M. (1983). Cadmium-metallothionein-induced nephropathy: a morphological and autoradiographic study of cadmium distribution, the development of tubular damage and subsequent regeneration. *J. Appl. Toxicol.* 3, pp. 237–244.
- Nair AR, Degheselle O, Smeets K, Van Kerkhove E, Cuypers A. (2013). Cadmium-induced pathologies: where is the oxidative balance lost (or not)? *Int. J. Mol. Sci.* 14, pp. 6116–6143.
- Nakura A, Higuchi C, Yoshida K, Yoshikawa H. (2011). PKC α suppresses osteoblastic differentiation. *Bone*. 48, pp. 476–484.
- Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L, Vangronsveld J, Van Hecke E, Staessen JA. (2006). Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *Lancet Oncol.* 7, pp. 119–126.
- Nicaud P, Lafitte A, Gros A. (1942). Les troubles de l'intoxication chronique par le cadmium. *Arch. Mal. Prof.* 4, pp. 192–202.
- Nicotra A, Schatten G. (1990). Propranolol, a beta-adrenergic receptor blocker, affects microfilament organization, but not microtubules, during the first division in sea urchin eggs. *Cell. Motil. Cytoskeleton*. 16(3), pp. 182–189.
- Nicotra A, Senatori O. (1989). Some characteristics of mitochondrial monoamine oxidase activity in eggs of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol. C*. 92(2), pp. 401–404.
- Nishimura N, Nishimura H, Ghaffar A, Tohyama CH. (1992). Localization of metallothionein in the brain of rat and mouse. *J. Histochem. Cytochem.* 40, pp. 309–315.
- Nishimura RN, Dwyer BE. (1996). Evidence for different mechanisms of induction of HSP70i: a comparison of cultured rat cortical neurons with astrocytes. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 36(2), pp. 227–239.
- Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH. (1992). Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science*. 258(5080), pp. 304–307.
- Nogawa K, Honda R, Yamada Y, Kido T, Tsuritani I, Ishizaki M, Yamaya H. (1986). Critical concentration of cadmium in kidney cortex of humans exposed to environmental cadmium. *Environ. Res.* 40(2), pp. 251–260.
- Nomiyama K, Nomiyama H. (1986). Critical concentration of 'unbound' cadmium in the rabbit renal cortex. *Experientia*. 42, pp.149.

- Nordberg GF, Friberg L, Elinder C, Kjellstrom T. (1985). Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal Volume 1: *Exposure, dose, and metabolism*. Boca Raton, FL. CRC Press.
- Nordberg M, Nordberg FG. (2000). Toxicological aspects of metallothionein. *Cell. Mol. Biol.* 46, pp. 451–463.
- Nriagu JO. (1980). "Production, Uses, and Properties of Cadmium", En: Cadmium in the Environment. Part 1 Ecological Cycling. Nriagu JO. (Editor), Wiley and Sons, Toronto, Ont., pp. 35-70.
- O'Connor TR. (1993). Purification and characterization of human 3-methyladenine-DNA glycosylase. *Nucleic. Acids. Res.* 21, pp. 5561–5569.
- Ohta H, Yamauchi Y, Nakakita M, Tanaka H, Asami S, Seki Y, Yoshikawa H. (2000). Relationship between renal dysfunction and bone metabolism disorder in male rats after long-term oral quantitative cadmium administration. *Indust. Health.* 38, pp. 339–355.
- Olsson IM, Bensryd I, Lundh T, Ottosson H, Skerfving S and Oskarsson A. (2002). Cadmium on the conformation and self-aggregation of Alzheimer's Tau on the proton gradient of synaptic vesicles and glutamate transport. *Neurochem. Int.* 59, pp. 272–279.
- Pacyna JM, Pacyna EG. (2009). An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environ. Rev.* 9, pp. 269-298.
- Panayi AE, Spyrou NM, Iversen BS, White MA, Part P. (2002). Determination of cadmium and zinc in Alzheimer's brain tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Neurol. Sci.* 195, pp. 1–10.
- Pari L, Murugavel P. (2007). Diallyl tetrasulfide improves cadmium induced alterations of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of rats. *Toxicology.* 234(1–2), pp. 44–50.
- Park SE, Kim ND, Yoo YH. (2004). Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer. Res.* 64, pp. 2652–2655.
- Pavia J, De Ceballos ML, Sanchez de la Cuesta F. (1998). Alzheimer's disease: relationship between muscarinic cholinergic receptors, betaamyloid and Tau proteins. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 12(5), pp. 473–481.
- Pendleton RG, Rasheed A, Roychowdhury R, Hillman R. (1998). A new role for catecholamines: ontogenesis. *Trends, Pharmacol. Sci.* 19(7), pp. 248-251.
- Prouillet C, Mazière J, Mazière C, Wattel A, Brazier M, Kamel S. (2004). Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaepferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochem. Pharmacol.* 67, pp. 1307–1313.
- Provias JP, Ackerley CA, Smith C, Becker LE. (1994). Cadmium encephalopathy: a report with elemental analysis and pathological findings. *Acta. Neuropathol. Berl.* 88, pp. 583-586.
- Prozialeck WC, Edwards JR. (2012). Mechanisms of cadmium-induced proximal tubule injury: new insights with implications for biomonitoring and therapeutic interventions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343, pp. 2–12.
- Rajanna B, Hobson M, Boykin M, Chetty CS. (1990). Effects of chronic treatment range of a lead smelting plant. *Nahrung.* 23(9–10), pp. 875–890.
- Rasola A, Sciacovelli M, Chiara F, Pantic B, Brusilow WS, Bernardi P. (2010). Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of permeability transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, pp. 726–731.
- Reale M, De Angelis F, Di Nicola M, Capello E, Di Ioia M, Luca G, Lugaresi A, Tata AM. (2012). Relation between pro-inflammatory cytokines and acetylcholine levels in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Int. J. Mol. Sci.* 13, pp. 12656–12664.

- Regunathan A, Glesne DA, Wilson AK, Song J, Nicolae D, Flores T, Bhattacharyya MH. (2003). Microarray analysis of changes in bone cell gene expression early after cadmium gavage in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 191, pp. 272–293.
- Rennolds J, Butler S, Maloney K, Boyaka PN, Davis IC, Knoell DL, Parinandi NL, Cormet-Boyaka E. (2010). Cadmium regulates the expression of the CFTR chloride channel in human airway epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 116, pp.349–358.
- Resende RR, Adhikari A. (2009). Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation. *Cell. Commun. Signal.* 7, pp. 20.
- Rikans LE, Yamano T. (2000). Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem. Mol. Toxicol.* 14, pp. 110–117.
- Risso-de Faverney C, Devaux A, Lafaurie M, Girard JP, Bailly B, Rahmani R. (2001). Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquat. Toxicol.* 53, pp. 65–76.
- Rojo AI, Sagarra MR, Cuadrado A. (2008). GSK-3 β down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J. Neurochem.* 105(1), pp. 92–202
- Ruediger T, Bolz J. (2007). Neurotransmitters and the development of neuronal circuits. *Adv Exp. Med. Biol.* 621, pp. 104–115
- Rusch GM, O'Grodnick JS, Rinehart WE. (1986). Acute inhalation study in rat of comparative uptake, distribution and excretion of different cadmium containing materials. *Am. Ind. Hyg. Assoc.* 47, pp. 754–763.
- Salmon A, Erb C, Meshorer E, Ginzberg D, Adani Y, Rabinovitz I, Amitai G, Soreq H. (2005). Muscarinic modulations of neuronal anticholinesterase responses. *Chem. Biol. Interact.* 157–158, pp. 105–113.
- Santos SD, Verveer PJ, Bastiaens PI. (2007). Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat. Cell. Biol.* 9, pp. 324–330.
- Sarchielli E, Pacini S, Morucci G, Punzi T, Marini M, Vannelli GB, Gulisano M. (2012). Cadmium induces alterations in the human spinal cord morphogenesis. *Biometals*, 25(1), pp. 63–74.
- Sarkar A, Ravindran G, Krishnamurthy V. (2013). A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level. *Int. J. Biotech.* 3, pp. 17–36.
- Sato M, Bremner I. (1993). Oxygen free radicals and metallothionein. *Free. Rad. Biol. Med.* 14, pp. 325–337.
- Schliebs, R. (2005). Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease—interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. *Neurochem. Res.* 30, pp. 895–908.
- Schnitzler, A.C., Lopez-Coviella, I., Blusztajn, J.K., (2008). Purification and culture of nerve growth factor receptor (p75)-expressing basal forebrain cholinergic neurons. *Nat. Protoc.* 3, pp. 34–40.
- Shaltiel G, Hanan M, Wolf Y, Barbash S, Kovalev E, Shoham S, Soreq H. (2013). Hippocampal microRNA-132 mediates stress-inducible cognitive deficits through its acetylcholinesterase target. *Brain. Struct. Funct.* 218, pp. 59–72.
- Shumilla JA, Wetterhahn KE, Barchowsky A. (1998). Inhibition of NF-kappa B binding to DNA by chromium, cadmium, mercury, zinc, and arsenite in vitro: evidence of a thiol mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* 349, pp. 356–362.
- Silman I, Sussman JL. (2005) Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5(3), pp. 293–302.
- Silva RF, Falcao AS, Fernandes A, Gordo AC, Brito MA, Brites D. (2006). Dissociated primary nerve cell cultures as models for assessment of neurotoxicity. *Toxicol. Lett.* 163, pp. 1–9.

- Smedman M, Potempska A, Rubenstein R, Ju W, Ramakrishna N, Denman RB. (1997). Effects of cadmium, copper, and zinc on beta APP processing and turnover in COS-7 and PC12 cells. Relationship to Alzheimer disease pathology. *Mol. Chem. Neuropathol.* 31(1), pp.13-28.
- Soreq H, Seidman S. (2001). Acetylcholinesterase new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2(4), pp. 294–302.
- Souza V, Bucio L, Gutiérrez-Ruiz MC. (1997). Cadmium uptake by a human hepatic cells line (WRL-68). *Toxicology.* 120, pp. 215–220.
- Szutowicz A, Bielarczyk H, Gul S, Ronowska A, Pawelczyk T, Jankowska-Kulawy A. (2006). Phenotype-dependent susceptibility of cholinergic neuroblastoma cells to neurotoxic inputs. *Metab. Brain. Dis.* 21(2-3), pp. 149-161.
- Squibb KS, Fowler BA. (1984). Intracellular metabolism and effects of circulating cadmium-metallothionein in the kidney. *Environ. Health. Perspect.* 54, pp. 31–35.
- Stacey NH, Cantilena LR, Klaassen CD. (1980). Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53, pp. 470–480.
- Sugawara, N Sugawara C. (1991). Gastrointestinal absorption of Cd-metallothionein and cadmium chloride in mice. *Arch. Toxicology.* 65, pp. 689-692.
- Taha EA, Sayed SK, Ghandour NM, Mahran AM, Saleh MA, Amin MM, Shamloul R. (2013). Correlation between seminal lead and cadmium and seminal parameters in idiopathic oligoasthenozoospermic males. *Cent. Eur. J. Urol.* 66, pp. 84–92.
- Takenaka S, Karg E, Kreyling WG, Lentner B, Schulz H, Ziesenis A, Schramel P, Heyder J. (2004). Fate and toxic effects of inhaled ultrafine cadmium oxide particles in the rat lung. *Inhal. Toxicol.* 16, pp. 83-92.
- Tallkvist J, Bowlus CL, Lönnerdal B. (2001). DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicol. Lett.* 122, pp. 171-177.
- Tamagno E, Parola M, Bardini P, Piccini A, Borghi R, Guglielmotto M, Santoro G, Davit A, Danni O, Smith MA, Perry G, Tabaton M. (2005). Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *J. Neurochem.* 92(3), pp. 628–636.
- Telisman S, Cvitkovic P, Jurasovic J, Pizent A, Gavella M, Rocic B. (2000). Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc and copper in men. *Environ. Health. Perspect.* 108, pp. 45–53.
- Templeton DM, Liu Y. (2010). Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chem. Biol. Interact.* 188, pp. 267–275.
- Thatcher RW, Lester ML, McAlaster R, Horst R. (1982). Effects of low levels of cadmium and lead on cognitive function in children. *Arch. Environ. Health.* 37, pp. 159-166.
- Thévenod F. (2009). Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, pp. 221–239.
- Thompson J, Bannigan J. (2008). Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod. Toxicol.* 25(3), pp. 304–315.
- Tjälve H, Henriksson J. (1996). Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *NeuroToxicology.* 20(2-3), pp. 181-195.
- Toiber D, Greenberg DS, Soreq H. (2009). Pro-apoptotic protein-protein interactions of the extended N-AChE terminus. *J. Neural. Transm.* 116(11), pp. 1435–1442.
- Toiber D, Berson A, Greenberg D, Melamed-Book N, Diamant S, Soreq H. (2008). N-acetylcholinesterase-induced apoptosis in Alzheimer's disease. *PLoS One.* 3(9), pp. e3108.
- Tuder RM, Petrache I. (2012). Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Invest.* 122, pp. 2749–2755.
- Vahter M, Berglund M, Nermell B, Akesson A. (1996). Bioavailability of cadmium from shellfish and mixed diet in women. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136 (2), pp. 332-341.

- Valko M, Morris H, Cronin MTD. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, pp.1161–1208.
- Van Kerkhove E, Pennemans V, Swennen Q. (2010). Cadmium and transport of ions and substances across cell membranes and epithelia. *Biometals*. 23, pp.823–855.
- Verougstraete V, Lison D, Hotz P. (2003). Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data. *J. Toxicol. Environ. Health*. 6, pp. 227–255.
- Vestergaard P, Shaikh ZA. (1994). The nephrotoxicity of intravenously administered cadmiummetallothionein: effect of dose, mode of administration, and preexisting renal cadmium burden. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126, pp. 240–247.
- Viarengo A, Nicotera P. (1991). Possible role of Ca^{2+} in the heavy metal cytotoxicity. *Comp. Biochem. Physiol.* 100, pp, 81-84.
- Voytko ML. (1996). Cognitive functions of the basal forebrain cholinergic system in monkeys: memory or attention? *Behav. Brain. Res.* 75, pp. 13–25.
- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*. 192, pp 95–117.
- Wang B, Du Y. (2013). Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, pp.1-12.
- Wang SH, Shih YL, Kuo TC, Ko WC, Shih CM. (2009). Cadmium toxicity toward autophagy through ROS-activated GSK-3 β in mesangial cells. *Toxicol. Sci.* 108, pp. 124–131.
- Ward NL, Hagg T. (2000). BDNF is needed for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons in vivo. *Exp. Neurol.* 162(2), pp. 297–310.
- Watkin RD, Nawrot T, Potts RJ, Hart BA. (2003). Mechanisms regulating the cadmium-mediated suppression of Sp1 transcription factor activity in alveolar epithelial cells. *Toxicology*. 184, pp. 157–178.
- Weast RC. (1986). CRC Handbook of Chemistry and Physics, 1985-1986, CRC Press. Inc, Boca Raton, Florida.
- Webb M, Etienne AT. (1977). Studies on the toxicity and metabolism of cadmium-thionein. *Biochem. Pharmacol.* 26, pp. 25-30.
- WHO (World Health Organization). (1992). "Environmental Health Criteria 135: Cadmium-Environmental Aspects", Geneva, Switzerland, pp. 156.
- WHO (World Health Organization). (2000). "Cadmium. In: Air quality guidelines for Europe", 2nd ed. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe.
- WHO (World Health Organization). (2008). "Cadmium. In: Guidelines for drinking-water quality", 3rd ed incorporating 1st and 2nd addenda. Vol. 1. Recommendations. Geneva, World Health Organization, pp. 317-319.
- WHO (World Health Organization). (2010). "Safety evaluation of certain food additives and contaminants in food". Geneva, World Health Organization (WHO Food Additives Series, No. 64.)
- WHO (World Health Organization). (2011). Guidelines for drinking-water quality, 4th ed, p. 327.
- Wong KL, Klaassen CD. (1982) Neurotoxic effects of cadmium in young rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63, pp. 330-337.
- Xing L, Boyce BF. (2004). Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, pp.709–720.
- Yamano T, DeCicco LA, Rikans LE. (2000). Attenuation of cadmium-induced liver injury in senescent male fischer 344 rats: role of Kupffer cells and inflammatory cytokines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162, pp. 68–75.
- Yokel RA. (2006). Blood brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal induced neurodegeneration. *J. Alzheimers. Dis.* 10 (2–3), pp. 223–253.

- Youn CK, Kim SH, Lee do Y, Song SH, Chang IY, Hyun JW, Chung MH, You HJ. (2005). Cadmium down-regulates human OGG1 through suppression of Sp1 activity. *J. Bio. Chem.* 280, pp. 25185–25195.
- Yuan Y, Jiang CY, Xu H, Sun Y, Hu FF, Bian JC, Liu XZ, Gu JH, Liu ZP. (2013). Cadmium-induced apoptosis in primary rat cerebral cortical neurons culture is mediated by a calcium signaling pathway. *PLoS One.* 8, pp. e64330.
- Zang Y, Odwin-Dacosta S, Yager JD. (2009). Effects of cadmium on estrogen receptor mediated signaling and estrogen induced DNA synthesis in T47D human breast cancer cells. *Toxicol. Lett.* 184, pp.134–138.
- Zarros A, Skandali N, Al-Humadi H, Liapi C. (2008). Cadmium (Cd) as a carcinogenetic factor and its participation in the induction of lung cancer. *Pneumon.* 21, pp.172–177.
- Zarros A, Kalopita K, Tsakiris S, Baillie GS. (2013). Can acetylcholinesterase activity be considered as a reliable biomarker for the assessment of cadmium induced neurotoxicity? *Food. Chem. Toxicol.* 56, pp. 406–410.
- Zhang Y, Yu J, Bu X, Ren T, Liu X, Yao L. (2011). An essential role of discoidin domain receptor 2 (DDR2) in osteoblast differentiation and chondrocyte maturation via modulation of Runx2 activation. *J. Bone. Miner. Res.* 26, pp. 604–617.
- Zheng WH, Bastianetto S, Mennicken F, Ma W, Kar S. (2002). Amyloid beta peptide induces Tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience.* 115(1), pp. 201–211
- Zimmermann M, Grosgen S, Westwell MS, Greenfield SA. (2008). Selective enhancement of the activity of C-terminally truncated, but not intact, acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* 104, pp. 221–232.
- Zimmermann M. (2013). Neuronal AChE splice variants and their nonhydrolytic functions: redefining a target of AChE inhibitors? *Br. JPharmacol.* 170(5), pp.953–967.

